



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Methodik der 3D-Rekonstruktion von kleinen Insekten am Beispiel der
Beinmuskulatur von Dipluren

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

| | |
|--|----------------------------------|
| Verfasser: | Markus Hable |
| Matrikel-Nummer: | 8825135 |
| Studienrichtung (lt. Studienblatt): | A 439 Zoologie |
| Betreuer: | Ao. Univ.-Prof. Dr. Günther Pass |

Wien, am 15.10.2008

Inhalt

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 5 |
| 1.1 | Methoden zur 3D-Rekonstruktion von Arthropoden..... | 5 |
| 1.1.1 | Mikro-Computertomographie (MCT)..... | 6 |
| 1.1.2 | Magnetresonanztomographie (MRT) oder Kernspintomographie | 9 |
| 1.1.3 | Confocal-Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) | 12 |
| 1.1.4 | Software | 13 |
| 1.2 | Skelettmuskelsystem des mesothorakalen Beines bei Dipluren | 14 |
| 1.3 | Ziele | 16 |
| 1.3.1 | 3D-Rekonstruktion..... | 16 |
| 1.3.2 | Skelettmuskelsystem des Beines bei Dipluren | 17 |
| 2 | Material und Methode..... | 18 |
| 2.1 | Arten | 18 |
| 2.2 | Semidünnschnittserien | 18 |
| 2.3 | Mikro-Computertomographie | 19 |
| 2.4 | 3D-Rekonstruktion..... | 19 |
| 2.5 | Terminologie und Bezeichnung..... | 19 |
| 3 | Ergebnisse | 21 |
| 3.1 | Skelettmuskelsystem des mesothorakalen Beines von drei Dipluren-Arten .. | 21 |
| 3.2 | 3D-Rekonstruktion..... | 40 |
| 4 | Diskussion..... | 45 |
| 4.1 | 3D-Rekonstruktion..... | 45 |
| 4.2 | Vergleich 2D zu 3D | 49 |
| 4.3 | Weitere Darstellungsmöglichkeiten mit Amira | 51 |
| 4.4 | Vor- und Nachteile von MCT und Semidünnschnitten | 53 |
| 4.5 | Die Methoden Confocal-Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) und Magnetresonanztomographie (MRT) | 54 |
| 4.6 | Skelettmuskelsystem des Beines bei Dipluren | 55 |
| 5 | Literatur | 62 |
| 6 | Danksagung | 65 |

Anhang

| | |
|-----------------------------------|----|
| Zusammenfassung | 67 |
| Abstract..... | 69 |
| Lebenslauf..... | 70 |
| Amira Programmdokumentation | 71 |

1 Einleitung

1.1 Methoden zur 3D-Rekonstruktion von Arthropoden

Die Insekten sind nicht nur die artenreichste Tiergruppe, sondern wegen ihrer Formenvielfalt auch ideale Objekte für vergleichende Untersuchungen in der Biologie. Durch die unterschiedlichsten morphologischen Anpassungen, aber auch durch immer wiederkehrende Muster ergibt sich der vergleichenden Evolutionsforschung ein hochkomplexes Feld aus Übereinstimmungen und Unterschieden.

Bis vor kurzer Zeit wurde in der Insektenmorphologie mit den klassischen Methoden gearbeitet. Dies sind vorwiegend Sektion unter dem Binokular und Erstellung von Semidünnschnitten, die unter dem Lichtmikroskop analysiert werden.

Beim Sezieren der Tiere stößt man durch die Kleinheit vieler Arten zwangsläufig bald an Grenzen. Hingegen können mittels Semidünnschnitten auch sehr kleine Strukturen erkannt werden. Allerdings geht beim Schneidevorgang die räumliche Zuordnung zwischen aufeinander folgenden Schnitten verloren und muss durch räumliches Vorstellungsvermögen wieder zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden.

Ein mögliches Hilfsmittel zur 3D-Rekonstruktion dabei ist, Zeichnungen der einzelnen Schnitte auf Transparentpapier anzufertigen und diese übereinander zu legen. Dieses dreidimensionale Bild muss für Publikationen oder Vorträge vom Autor wieder in einer 2-dimensionalen Ebene dargestellt werden. Je nach Fähigkeit des Zeichners geht dabei die 3-dimensionale Information mehr oder weniger wieder verloren.

Durch technische Weiterentwicklung kommen in der Mikroanatomie immer häufiger neue Methoden zum Einsatz. Diese Methoden haben den Vorteil, dass alle Strukturen räumlich vorliegen, und mit einer geeigneten Software dreidimensionale Abbildungen erstellt werden können. Außerdem arbeiten diese Methoden weitgehend zerstörungsfrei und so können seltene oder teilweise auch lebende Tiere untersucht werden.

Die drei derzeit am häufigsten diskutierten und praktizierten Methoden sind Mikro-Computertomographie, Kernspintomographie und Confocal-Laserscanning-Mikroskopie.

Erzeugt wird dabei ein räumlicher Datensatz, dessen kleinste Einheit - ähnlich wie ein

Pixel in zweidimensionalen Darstellungen - ein Voxel im dreidimensionalen Raum ist. Ein Voxel kann mit der realen Objektgröße in Relation gebracht werden, und somit zeigt ein Voxel gleichzeitig die kleinstmögliche Auflösung in den drei Raumrichtungen an.

1.1.1 Mikro-Computertomographie (MCT)

Bei der herkömmlichen Röntgentechnik wird das Objekt von einer Röntgenquelle durchleuchtet und auf einem zweidimensionalen Röntgenfilm abgebildet. Dabei gehen die Informationen der dritten Dimension weitgehend verloren. So kann etwa schwer festgestellt werden, ob es sich bei helleren Bereichen (durch abgeschwächte Röntgenstrahlen entstanden) um ein Material mit höherer Dichte oder um eine größere Durchleuchtungsdicke handelt.

Die Computertomographie (CT) umgeht dieses Problem, indem sie viele Röntgenbilder aus unterschiedlichen Richtungen erstellt (0° bis 180°). Dabei entsteht für jede Schicht ein so genanntes Sinogramm. Im nächsten Schritt wird Schicht für Schicht eine gefilterte Rückprojektion durchgeführt bzw. berechnet und somit ein dreidimensionaler Datensatz erzeugt (siehe Abb. 1). Die mathematischen Grundlagen dafür lieferte bereits 1917 Johann Radon (Radon, 1917).

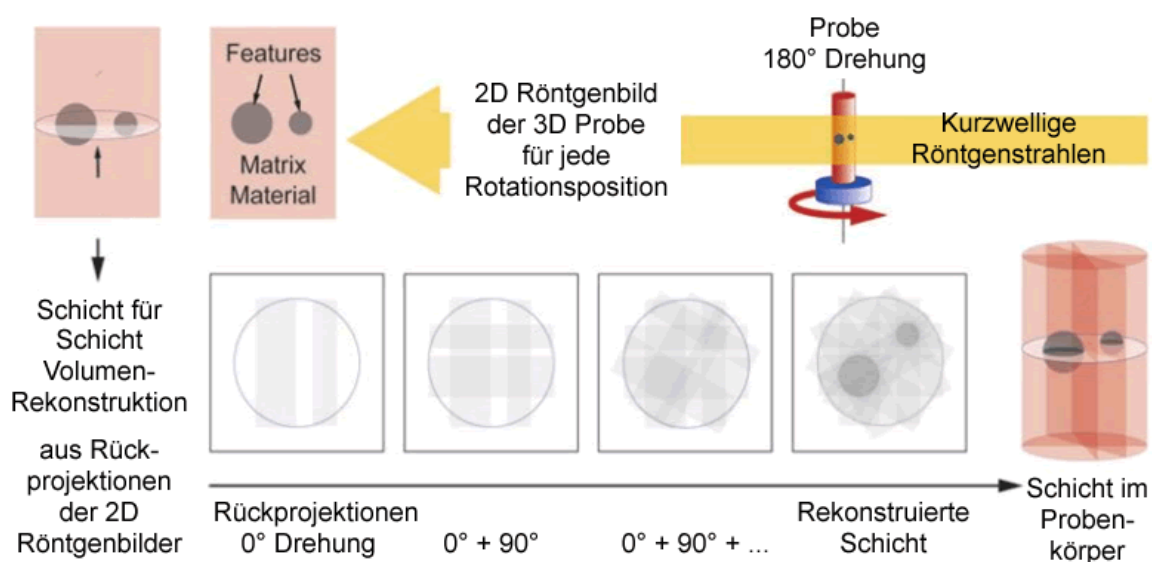


Abb. 1: Funktionsprinzip der MCT: Bei jeder Rotationsposition wird ein 2D Röntgenbild erzeugt. Durch Rückprojektionen der 2D-Röntgenbilder wird Schicht für Schicht ein 3D-Datensatz berechnet (verändert nach Betz et al. 2007).

Nachdem die Technik nach und nach verfeinert wurde, konnten ab den 1980er Jahren CT-Aufnahmen vor allem für medizinische Zwecke durchgeführt werden. Dabei wurde eine maximale Auflösung von 1mm erreicht (Kalender, 2006). Mit der Erschließung der hochenergetischen Synchrotron-Strahlung und rasanter Verbesserungen der Geräte kann mittlerweile eine Auflösung von 0,25 μm erreicht werden (Betz et al., 2007). Allerdings ist die Auflösung, neben der maximal möglichen Auflösung des Gerätes, immer von der Probengröße abhängig. Je kleiner der Objektausschnitt und je mehr Einzelaufnahmen innerhalb einer 180°-Drehung, desto höher ist die Endauflösung.

Mit speziellen Techniken kann in der Nano-CT eine Auflösung von bis zu 15 nm in zwei Raumrichtungen erzielt werden (Attwood, 2006), allerdings ist die Probengröße dabei auf wenige μm beschränkt (Sinha, 2004).

Vor allem für medizinische Untersuchungen an Zähnen und Knochen ist die MCT (und natürlich auch die CT) sehr gut geeignet (Hörnschemeyer et al., 2002).

Das große Problem bei Weichteilen ist die geringe Absorption der Röntgenstrahlung (Wirkner & Richter, 2004), und somit ein geringer Grauwertunterschied verschiedener Weichteilgewebe. Dies kann entweder durch Einbringung eines Kontrastmittels in gewisse Gewebeteile (Wirkner & Richter, 2004; Hable et al., 2006) oder durch die Verwendung von Phasenkontrast kompensiert werden (Hörnschemeyer, 2002; Betz, 2007).

Zum Unterschied zur Absorptionskontrast-Methode befindet sich bei der Phasenkontrast-Methode der Detektor von der Probe weiter entfernt (siehe Abb. 2), wodurch die Signale an den Gewebegrenzen verstärkt werden.

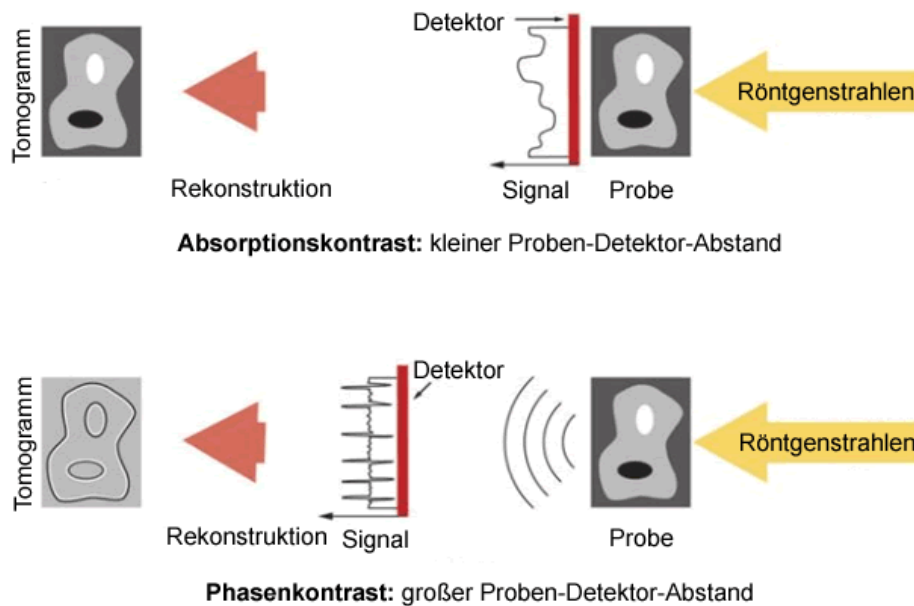


Abb. 2: Schematischer Vergleich der herkömmlichen Methode (Absorptionskontrastmethode) zur Phasenkontrastmethode (verändert nach Betz et al. 2007).

Eine der Pionierarbeiten in der Insekten-MCT ist die Untersuchung der Kopfstruktur von *Priacma serrata* von Hörnschemeyer (2002).

Derzeit kommen zwei Gerätetypen zum Einsatz. Zum einen Stand- oder Desktopgeräte, die die Elektronenstrahlen bündeln und kegelförmig aufgefächert ausstrahlen (siehe Abb. 3). Zum Anderen Geräte, die am Teilchenbeschleuniger (Synchrotron) angeschlossen werden und an denen hochenergetische parallele Elektronenstrahlen benutzt werden (siehe Abb. 4).

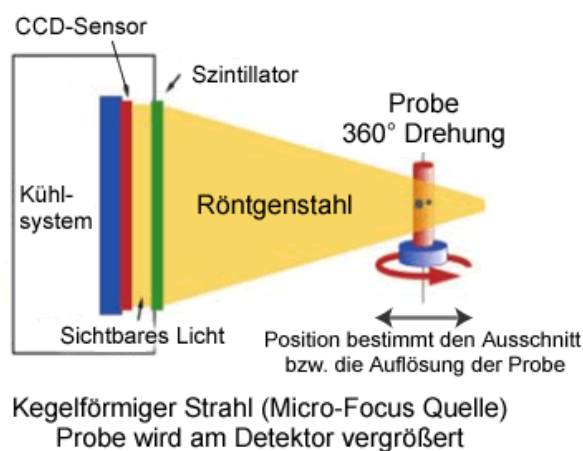


Abb. 3: Funktionsprinzip eines Stand- oder Desktop-Mikrocomputertomographen: Die Röntgenstrahlen werden Kegelförmig ausgestrahlt und das Probenbild dadurch vergrößert über einen Sensor aufgenommen (verändert nach Betz et al. 2007).

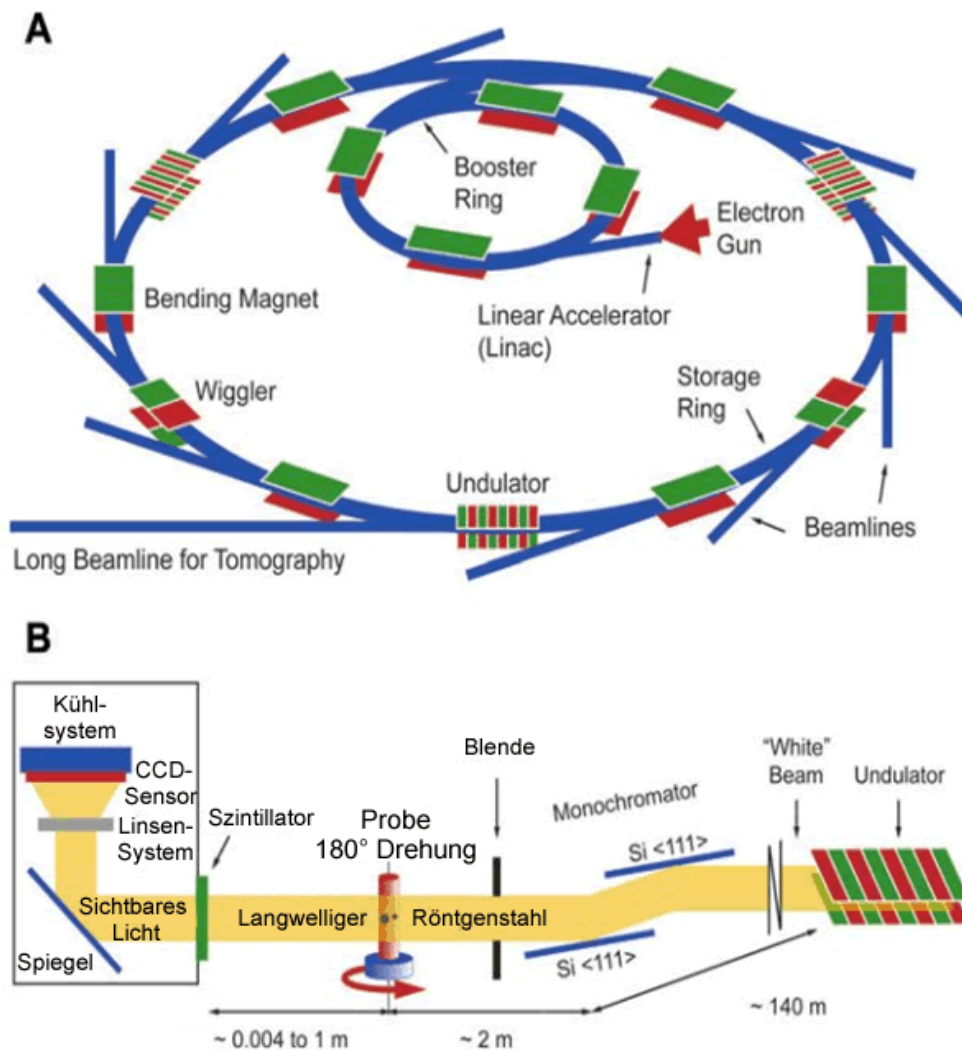


Abb. 4: A: Funktionsprinzip eines Teilchenbeschleunigers: In eine Kreisbahn geschossene Elektronen werden unter Vakuum durch Magnetfelder auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt. Die dabei anfallende Strahlung kann für unterschiedliche Zwecke genutzt werden. B: Funktionsprinzip eines Mikrocomputertomographen der an einem Teilchenbeschleuniger angeschlossen ist: Hochenergetische parallele Röntgenstrahlen werden nach Durchleuchtung der Probe in sichtbares Licht umgewandelt und anschließend, durch ein Linsensystem vergrößert und mittels Sensor aufgenommen (verändert nach Betz et al. 2007).

1.1.2 Magnetresonanztomographie (MRT) oder Kernspintomographie

Die Physikalische Grundlage der magnetischen Kernresonanz ist der Kernmagnetismus in den Atomkernen. Durch die Rotation (Spin) des Protons bzw. Neutrons im Atomkern erzeugt jedes Teilchen ein magnetisches Moment. Bei gerader Kernteilchenzahl heben sich die magnetischen Momente gegenseitig auf. Hingegen wird bei ungerader

Kernteilchenzahl ein Kernspin erzeugt und somit ein magnetische Feld nach außen wirksam. Solche Atome sind z.B. Wasserstoff, Kohlenstoff, Natrium und Phosphor. Bisher wurde für die Magnetresonanztomographie vorwiegend der Kernmagnetismus der im Gewebe zahlreich vorhandenen Wasserstoffatome genutzt.

Im Normalfall ist die Rotationsachse der einzelnen Wasserstoffatome zufällig ausgerichtet (siehe Abb. 5). Wird die Probe aber einem statischen Magnetfeld ausgesetzt, richten sich die Rotationsachsen der Kernspins entlang der Feldlinie wie Kompassnadeln aus (siehe Abb. 6).

Die Abbildung idealisiert allerdings das Ausmaß der Polarisation. Bei den gebräuchlichen Geräten wird ein biologisch harmloses Magnetfeld erzeugt (Hart et al, 2002), dabei ist nur ein geringer (ca. ein millionstel) Anteil der Spins polarisiert.

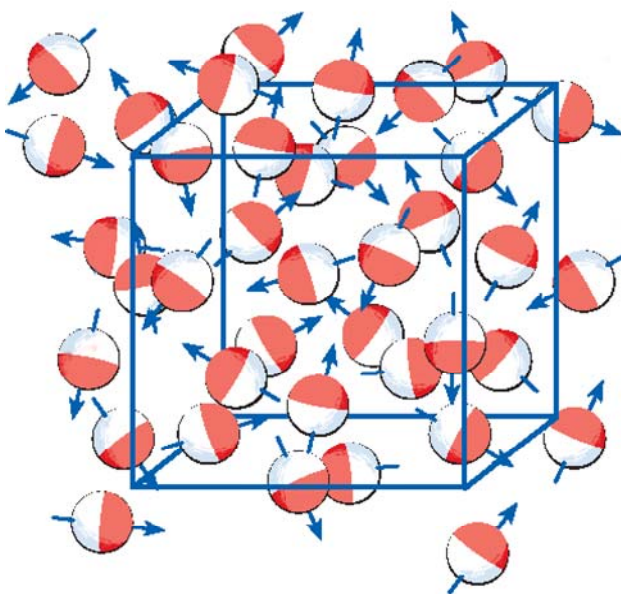


Abb. 5: Zufällige Orientierung der Rotationsachsen der Kernspins unter Raumbedingungen (aus www.technik-elite.de/kernspintomographie.ppt)

Durch einen Hochfrequenzimpuls können die Rotationsachsen vorübergehend aus der parallelen Ausrichtung ausgelenkt werden. Der Hochfrequenzimpuls muss je nach Magnetfeldstärke und Atom eine bestimmte Resonanzfrequenz (=Larmorfrequenz) besitzen, um diese Auslenkung zu bewerkstelligen.

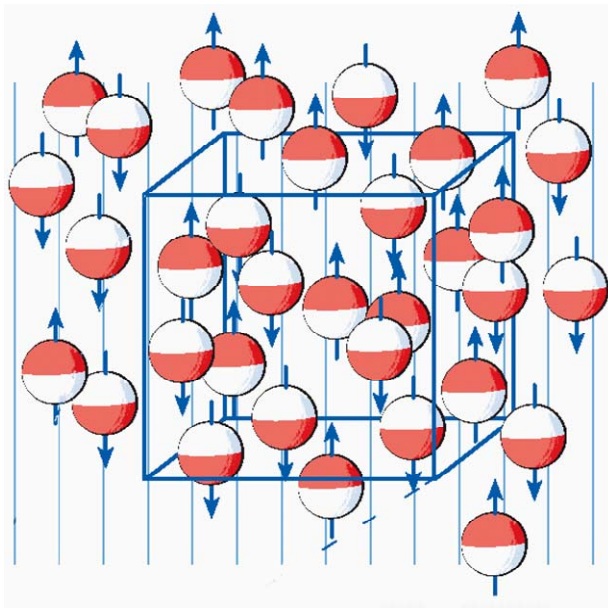


Abb. 6: Ausrichtung der Rotationsachsen der Kernspins im Magnetfeld (aus www.technik-elite.de/kernspintomographie.ppt)

Je nach Gewebe dauert es eine gewisse Zeit (T1-Relaxionszeit) bis zum Wiedererreichen des parallelen Ausrichtungs-Zustandes. So haben Gewebe mit kurzen T1-Relaxionszeiten (z.B. Fett oder Kontrastmittel) eine hohe Signalintensität, hingegen Stoffe mit langen T1-Relaxionszeiten (wie z.B. Wasser) eine niedrige Signalintensität.

Zusätzlich tritt durch den Hochfrequenzimpuls eine Quermagnetisierung auf, die nach einer gewissen Zeit wieder exponentiell zerfällt (T2-Relaxionszeit). Auch diese ist gewebeabhängig. Hier hat z.B. Wasser eine hohe Signalintensität. So werden je nach Wunsch T1- oder T2-gewichtete Aufnahmen erstellt.

Um räumliche Ergebnisse zu erzielen, bedient man sich der oben erwähnten Larmorfrequenz. Da diese neben der Atomart auch von der Stärke des Magnetfeldes abhängig ist, wird die Probe nicht in ein einheitliches Magnetfeld gelegt, sondern in magnetische Gradientenfelder. Bei einer gewissen Larmorfrequenz findet so die Auslenkung der Rotationsachsen nur an einem bestimmten Punkt in der Probe statt.

MRT wird seit 1987 (Gassner et al., 1987) in der Insektenmorphologie eingesetzt. Der kritische Faktor für kleine Strukturen ist aber die Auflösung (Hart et al., 2002). Bisherige Aufnahmen erreichen eine maximale Auflösung von $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 75\mu\text{m}$ (Hart et al., 2002) bzw. $15,6\mu\text{m} \times 15,6\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ (Haddad et al., 2004).

1.1.3 Confocal-Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Bei der konventionellen Lichtmikroskopie wird das von einer Lampe ausgestrahlte Licht durch die Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert. Das Licht, das vom Objekt ausgeht, wird durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Das dadurch entstandene Bild wird durch die Okularlinse betrachtet. Neben dem Licht aus der Brennebene des Objektivs (in Abb. 7 rot dargestellt) erreicht auch unfokussiertes Licht, aus Bereichen die außerhalb der Brennebene liegen, (in Abb. 5 blau und grün dargestellt) das Auge des Betrachters. Ein Problem besteht darin, dass durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops verringert und das Bild dadurch unscharf wird.

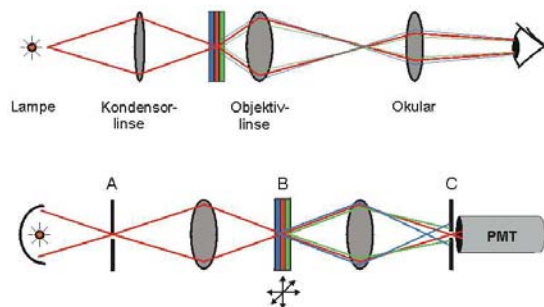


Abb. 7: Schematischer Vergleich eines Lichtmikroskops (oben) und eines Confocal-Lasermikroskops (unten). Weitere Erläuterung im Text (aus www.sinnesphysiologie.de).

Bei der konfokalen Mikroskopie wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Hier finden wir statt der Kondensorlinse eine Linse, die der Objektivlinse gleicht. Bei diesem Mikroskop kommen zwei Lochblenden mit sehr geringen Durchmessern zur Anwendung. Dadurch kann Licht, das von Teilen des Objekts außerhalb der Brennebene stammt, nicht durch Lochblende C gelangen und wird dadurch ausgeblendet (Abb. 7 unten: grüne und blaue Strahlen). Blende A (Abb. 7: A) grenzt zusätzlich die Ausleuchtung des Objekts auf einen Punkt ein (Abb. 7: B). Die Symmetrie des Systems ergibt, dass die Lochblenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal sind.

In den Photomultiplier (Abb. 7: PMT) gelangt also nur Licht von einem Punkt aus der Brennebene des Objekts, welches von diesem in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Das konfokale Mikroskop generiert somit im Unterschied zum konventionellen Mikroskop nur einen Bildpunkt. Daher ist es notwendig, das Objekt Punkt für Punkt zu scannen, um das gesamte Objekt erfassen zu können. Dabei wird entweder das Objekt

oder der Strahlengang um jeweils eine kleine Strecke verschoben, bevor der nächste Punkt erfasst wird. Die Zusammensetzung dieser Bildpunkte zu einem kompletten Bild erfolgt im Rechner. Weiters kann über einen Motor das Objekt auch in Richtung des Strahlengangs (in Z-Richtung) bewegt werden. Dadurch werden nacheinander einzelne Schichten des Objekts gerastert bzw. abgebildet und mit Hilfe des Rechners zu einem dreidimensionalen Datensatz zusammengesetzt.

Diese Methode kann aber nur bei Objekten angewendet werden, die transparent sind und auch fluoreszieren (Betz et al., 2007; Klaus et al. 2002). Nachdem die Objekte mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt werden können, bzw. bei Hexapoden die Kutikula selbstfluoreszierend ist, stellt die fehlende Transparenz das weit aus größere Problem dar.

1.1.4 Software

Alle erwähnten Methoden erzeugen einen dreidimensionalen Datensatz. Um diesen zu visualisieren, kommen Programme, die für die Humanmedizin entwickelt wurden, zum Einsatz. Die häufigsten sind Amira (Hörnschemeyer et al., 2002), VG StudioMax (Fanenbruck 2003), Imaris (Klaus et al. 2002; Wirkner & Richter 2004) Maya (Baum et. al. 2007) und SurfDriver (Fanenbruck & Harzsch 2005)

Prinzipiell stehen zwei alternative Möglichkeiten der Visualisierung zur Verfügung: Oberflächenvisualisierung (*surface rendering*) und Volumenvisualisierung (*volume rendering*). Mit Hilfe von Programmen zur Oberflächenrekonstruktion lassen sich visuell ausgezeichnete Ergebnisse erzielen. Der erforderliche Zeitaufwand ist aber sehr hoch, da vor der eigentlichen Oberflächenrekonstruktion im Rahmen der Image Segmentation Schnitt für Schnitt die interessierenden Strukturen von Hand umfahren werden müssen (Fanenbruck, 2003). Diese umrandeten Strukturen werden in der dritten Raumrichtung verbunden und in ein räumliches Gitter umgerechnet.

Im Gegensatz zur Oberflächenvisualisierung, die meist mittels Polygontechnik nur die Oberfläche eines Modells beschreibt, besitzt die Volumenvisualisierung auch Informationen über dessen Inhalt. Jedes Voxel besitzt bei solchen Volumengrafiken einen Dichte-Wert nach bestimmten Kriterien (z.B. Graustufen), und ein Voxel wird dementsprechend stärker oder schwächer dargestellt. So entsteht eine semitransparente Voxel-Wolke des 3D-Datensatzes. Volumengrafiken sind äußerst schnell zu erstellen, erfor-

dern aber wesentlich höhere Rechenkapazitäten, im Vergleich zur vektorbasierten Oberflächenvisualisierung (Fanenbruck, 2003).

1.2 Skelettmuskelsystem des mesothorakalen Beines bei Dipluren

Die primär flügellosen Basalen Hexapoda sind morphologisch eine heterogene Gruppe, deren Verwandtschaftsverhältnisse seit langer Zeit umstritten sind. Während die nahe verwandtschaftliche Stellung der Archaeognatha und Zygentoma (Ectognatha) zu den Pterygota breite Zustimmung findet, gibt es hingegen bei Collembola, Diplura und Protura unterschiedliche Anschauungen über die jeweilige phylogenetische Stellung.

Durch molekulare Untersuchungen und neuen computerunterstützten Stammbaumberechnungen ist die Diskussion über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Gruppen der Basalen Hexapoda, aber auch die Position der Hexapoda innerhalb der Arthropoda in den letzten Jahrzehnten neu entflammt (Szucsich & Pass 2008).

Neben den zur Zeit häufig publizierten molekularen Arbeiten werden seit Wheeler et al. (2001) bzw. Beutel & Gorb (2001) vermehrt Hexapoda-Stammbäume aus morphologischen Daten-Matrixen rekonstruiert. Oft muss dabei auf spärlich vorhandene morphologische Arbeiten zurückgegriffen werden. Unter vielen anderen Merkmalen werden häufig auch die der Beine verwendet. Nur zwei Arbeiten von Manton (1972, 1977) sind ausreichend detailreich, um als Basis für die Merkmalskodierung der Diplurenbeine zu dienen.

Das Bein der Dipluren besteht aus sechs gelenkig verbundenen Podomeren und ist mit Coxa, Trochanter, Femur, Tibia, Tarsus und Pretarsus ein typisches Insektenbein.

Die Coxa artikuliert etwas anterior über ein dicondyles Gelenk mit dem Thorax, wobei das ventrale Gelenk mit dem Sternit besonders fest ausgebildet ist. Die Drehachse liegt vertikal, dadurch kann das Bein vor und zurück geschwungen werden. Eine Drehmöglichkeit wie bei vielen Myriapoda ist nicht vorhanden (Manton, 1972, siehe Abb. 8).

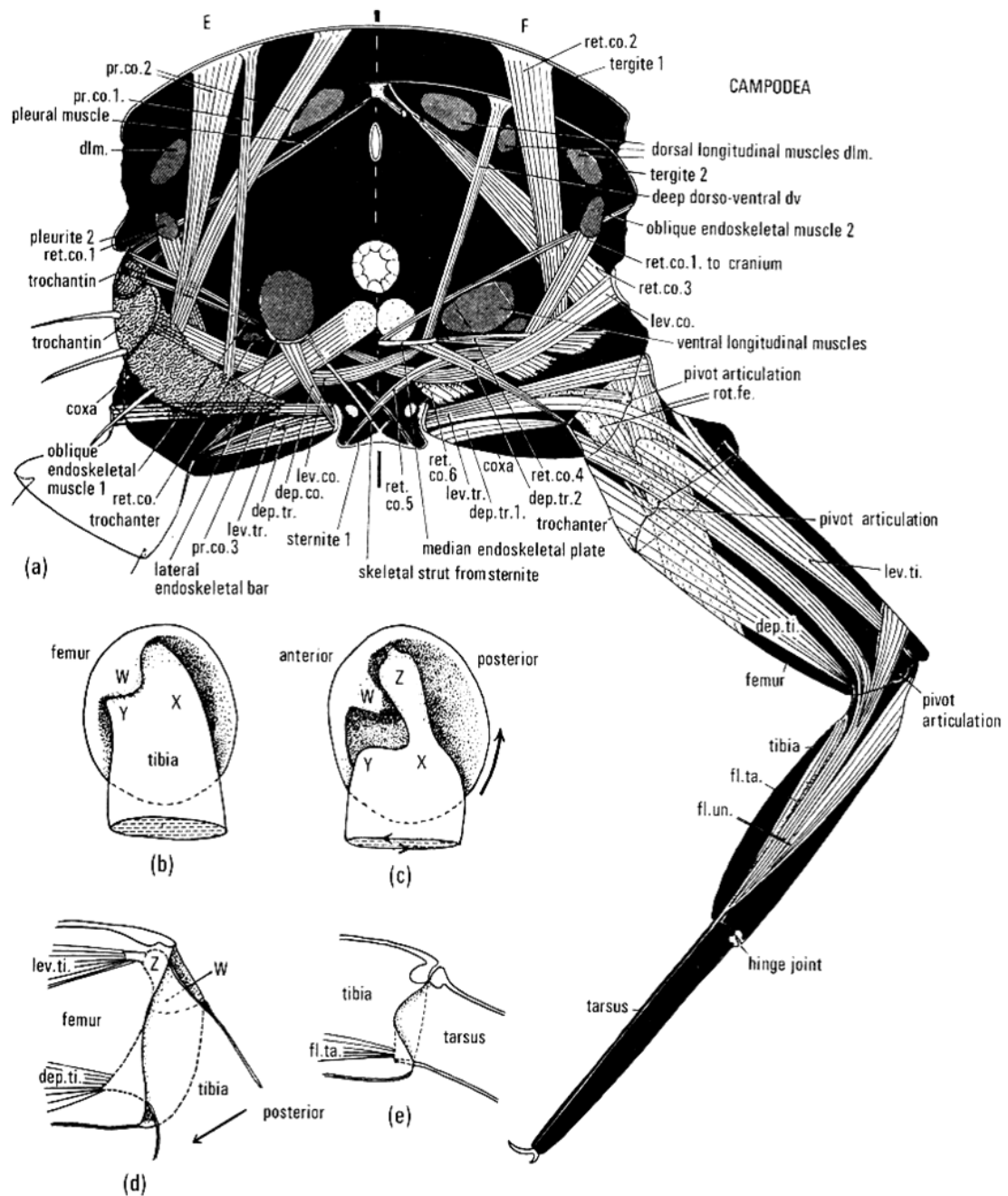


Abb. 8: Campodea a: Querschnitt durch Thorax und rechtes mesothorakales Bein; b, c und d: Femur-Tibia-Gelenk; e: Tibia-Tarsus-Gelenk. Weitere Erläuterung im Text. (leicht verändert nach Manton 1977)

Das Coxa-Trochanter-Gelenk wird von Manton (1972) als dicondyl, mit einer anterioren und einer posterioren Artikulation, beschreiben. Drei Muskeln bewirken eine Auf- und Abbewegung des Trochanter. Ein Levator- und ein Depressor-Muskel haben ihren Ursprung an der ventralen proximalen Coxa, ein weiterer Depressor-Muskel entspringt (bei *Campodea*) dem medianen Endoskelett des Thorax (siehe Abb. 8).

Manton (1972) beschreibt das Trochanter-Femur-Gelenk als monocondyl, mit einer anterioren Artikulation. Eine posteriore Artikulation fehlt. Ein einzelner Muskel, der femorale Rotator, bewirkt laut Manton eine Drehbewegung. Ein Antagonist zu diesem Muskel ist nicht vorhanden. Bei *Campodea* besteht dieser Muskel aus zwei Teilen. Beide Teile haben ihren Ursprung am proximalen Trochanterrand (etwas dorsal), ein Teil inseriert am proximalen posterioren Rand des Femur, der zweite an der ventralen Fläche des Femur. Bei *Japyx* ist der zweite Muskelteil nicht vorhanden.

Das Femur-Tibia-Gelenk ist nach den Arbeiten von Manton ein hoch spezialisiertes monokondyles Drehgelenk und liegt an der Dorsalseite des Beines. Beide Podomeren sind an der Bildung einer auffälligen Gelenksstruktur beteiligt. Die Tibia formt einen dorsalen Processus (Z). Ein femoraler Processus (W) liegt anterior davon und ist mit einer anterioren Schulter der Tibia (Y) verbunden. Zwei Muskeln inserieren an dieser Region. Einer inseriert an der Dorsalseite am tibialen Processus Z, und ein zweiter an der ventralen Basis der Tibia. Ersterer besteht aus drei Muskelbündel. Ein Bündel entspringt im ventralen proximalen Bereich der Coxa, eines der dorsalen Wand des Trochanters und eines der anterioren Wand des Trochanters (siehe Abb. 8: a,b,c und d).

Das Tibia-Tarsus-Gelenk wird von Manton als starkes Scharniergelenk beschrieben. Ein schlanker Muskel inseriert am posterioren ventralen Tarsus und entspringt an der proximalen ventralen Tibia-Wand (siehe Abb. 8: e).

Die tarsale Klaue besteht aus zwei starken Haken. Eine lange Sehne inseriert an der Klauenbasis und starke Muskeln, die an Tibia, Femur und Trochanter entspringen, setzen im Bereich der distalen Tibia an ihr an.

1.3 Ziele

1.3.1 3D-Rekonstruktion

Amira ist ein sehr komplexes Programm mit vielen Funktionen, die für die vorliegenden Problemstellungen nicht relevant sind.

Aufgabe dieser Diplomarbeit ist unter anderem, die Möglichkeiten der Anwendbarkeit von Amira für die Visualisierung von Semidünnschnittdaten zu prüfen und eine Programmdokumentation (siehe Anhang) zu erstellen.

Ein weiteres Ziel ist mit Amira die MCT-Daten zu visualisieren, und mit den Semidünnschnitt-Ergebnissen zu vergleichen.

Es sollen Möglichkeiten der Veröffentlichung und Darstellungen der 3D-Daten erarbeitet und diskutiert werden. Unter Berücksichtigung folgender Fragen: (i) Welchen Vorteil haben 3D-Visualisierungen gegenüber 2D-Abbildungen? (ii) Welche Möglichkeiten bestehen mit 3D-Daten homologe Strukturen unterschiedlicher Arten vergleichbar darzustellen? (iii) Wie weit sind 3D-Daten mit alten Abbildungen vergleichbar?

Fragestellungen der 3D-Rekonstruktion von Arthropoden sollen beispielhaft an der Rekonstruktion des Beines der Dipluren erarbeitet werden. Für einige Punkte wurden zur klareren Darstellung zusätzliche Datensätze herangezogen.

1.3.2 Skelettmuskelsystem des Beines bei Dipluren

In dieser Arbeit soll das Skelettmuskelsystem des mesothorakalen Beines von drei Dipluren-Arten exakt rekonstruiert, analysiert und homologe Strukturen miteinander verglichen werden. Neben der zwei von Manton untersuchten Unterordnungen Campoideidea und Japygidea soll auch von den Projapygidea, der dritten Dipluren-Unterordnung, eine Art untersucht werden.

Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollen im Rahmen des Forschungsprojektes „Are the Hexapoda monophyletic? Conflicting hypotheses regarding their relationships to myriapods and crustaceans“ einen Beitrag zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Basalen Hexapoda liefern.

2 Material und Methode

2.1 Arten

Folgende Arten wurden nach der 3D-Rekonstruktion auch morphologisch analysiert:

- *Campodea augens* Silvestri 1936 – Diplura (Campodeidae), leg. & det. Szucsich, N.; Breitenfurt, Wald; 16.05.2004
- *Catajapyx aquilonaris* Silvestri 1931 – Diplura (Japygidae), leg. & det. Szucsich N.; Wien, Leopoldsberg, Nasenweg; 20.10.2004
- *Octostigma sinensis* – Diplura (Projapygidae), leg. & det. Luan Yunxia; China, Guangdong; 03.2002

Zusätzlich wurden noch folgende Arten für 3D-Rekonstruktionsversuche verwendet:

- *Podura aquatica* Linnaeus 1758 – Collembola, leg. & det. Szucsich N.; Wien; 27.08.2004
- *Austroglyphus* sp. – Acari Computertomographie Daten

2.2 Semidünnschnittserien

Die Tiere wurden mit Kohlendioxid betäubt und 36 Stunden in Duboscq-Brasil (Böck, 1989) fixiert. Danach mit 70% Ethanol gewaschen und in 70% Ethanol aufbewahrt.

Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) wurde die Probe zuerst in Propylenoxid (3 mal für je 10 Minuten) und anschließend in eine 1:1-Mischung von Propylenoxid und ERL-4206 Epoxyharz transferiert (Spurr, 1969). Des Weiteren nach der Verdunstung des Propylenoxids über Nacht, unter Vakuum in ERL-4206 Epoxyharz eingebettet (Pernstich et al., 2003).

Mittels Reichert Ultracut Om U3 und Diamantmesser wurden Semidünnschnittserien mit einer Schnittdicke von 1µm hergestellt. Teilweise wurden die Schnittserien gebändert hergestellt (Blumer et al., 2002).

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit einer Mischung von 1% Azur II und 1% Methylen-Blau in einer wässrigen 1% Borax-Lösung (Richardson et al., 1960), 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, für etwa 30 sec. bei 90°C.

Die Analyse erfolgte unter einem Nikon Lobophot-2 Mikroskop und einem Nikon Microphot-FXA Mikroskop.

Digitalisiert wurden die Schnitte mit einer Nitikon Digita Sight DS-5M Digitalkamera am Nikon Eclipse E 800M Mikroskop.

2.3 Mikro-Computertomographie

Nach der Dehydrierung der Tiere in Ethanol erfolgte die für die Tomographie erforderliche Trocknung der Proben in Hexamethyldisilazan.

Die röntgentomographischen Aufnahmen wurden an der Beamline ID19 des ESRF-Synchrotron in Grenoble erstellt. Einzelaufnahmen erfolgten mit einem Röntgenstrahl von 15.5 KeV, einer Dauer von 0,5 Sekunden und einer Auflösung von 0,7-1,4 Microns pro Pixel.

2.4 3D-Rekonstruktion

Bildbearbeitung und Dateiumbenennung vor der eigentlichen 3D-Rekonstruktion erfolgten mittels ACDSee 7.0 (ACD Systems) und Photoshop 7 (Adobe).

Die Alinierung und die 3D-Rekonstruktion wurde mittels Amira 3.1 durchgeführt. Amira wurde ursprünglich vom Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin entwickelt und wird derzeit von der Firma Visage Imaging GmbH vermarktet.

Das Programm kam unter Windows XP auf einem Pentium 4 PC, mit 3,5 GHz Hauptprozessor und 3,5 GB Arbeitsspeicher zum Einsatz.

2.5 Terminologie und Bezeichnung

Die Bezeichnung der Podomere erfolgt in der üblichen Form mit Coxa, Trochanter, Femur, Tibia, Tarsus and Pretarsus (von proximal nach distal).

Um die Vielzahl an Muskelsträngen und Sehnen in einem Bein zu unterscheiden und deren Lage zu beschreiben, wurde folgendes Bezeichnungssystem eingeführt:

Die Muskel-Bezeichnung beginnt mit einem **M** in Großbuchstaben. Nach einem Punkt folgen, durch einen Bindestrich getrennte, Information über Ursprung und Insertion des Muskels. Die ersten beiden Kleinbuchstaben bezeichnen das Podomer (cx = coxa; tr =

trochanter; fe = femur; ti = tibia; ta = tarsus; pr = pretarsus). Durch einen Schrägstrich getrennt wird durch bis zu zwei Kleinbuchstaben die Position innerhalb des Podomers beschrieben (v = ventral, d = dorsal, a = anterior, p = posterior). Eine Zahl ist nach dem großen M angegeben, wenn verschiedene Bündel in einem Muskel vorhanden sind. Zum Beispiel ist **M2.cx/va-tr/d** das zweite Muskelbündel mit dem anterior und ventral liegenden Ursprung an der Coxa und der Insertion an der dorsalen Seite des Trochanters.

Für eine leichte Unterscheidung zu den Muskeln, werden Sehnen mit einem großen T (englisch: tendon) beschrieben. Abgegrenzt durch einen Doppelpunkt erfolgt die Information über die Ansatzstelle. Beispielsweise identifiziert sich **T:ti/dp** als Sehne, die an der Tibia posterior an der dorsalen Mittellinie ansetzt. Muskeln, die an einer solchen Sehne inserieren, haben demnach z.B. folgende Bezeichnung: **M.tr/ad-T:ti/dp**. Dieser Muskel entspringt an der anterioren dorsalen Fläche des Trochanters und inseriert an der posterioren dorsalen Seite der Tibia über die Sehne **T:ti/dp**. Um einen einfachen Vergleich zu den Arbeiten von Manton (1972) zu ermöglichen, wurde die Bezeichnung der Kutikulastrukturen an der Femur-Tibia-Verbindung (**W**, **Y** and **Z**) beibehalten bzw. ergänzt. So ist nach dem Doppelpunkt hinzugefügt, zu welchen Podomer diese Struktur gehört (**W:fe**, **Y:ti**, **Z:ti**). Zusätzlich wurde dieses System zur Bezeichnung ähnlicher Strukturen an anderen Gelenken weitergeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Skelettmuskelsystem des mesothorakalen Beines von drei Dipluren-Arten

Das Diplurenbein von allen drei untersuchten Dipluren ist aus sechs Podomere aufgebaut (siehe Abb. 9). Die Beschreibung erfolgt den Segmenten folgend von proximal nach distal. Abschnitte mit kurzen Beschreibungen der einzelnen Podomere wechseln mit genaueren Beschreibungen der Gelenksregionen zwischen angrenzenden Podomeren ab. Der Vergleich der Gelenksregionen umfasst kutikuläre Verbindungen, schwach sklerotisierte Bereiche wie Gelenksmembranen und interpodomere Muskulatur. Jeder Abschnitt ist in einen Bereich mit übereinstimmenden Mustern und einen Bereich mit variablen Mustern der drei Diplurenarten gegliedert. Die Beschreibung eines Muskels erfolgt in jenem Kapitel der Gelenksregion, an der er inseriert. Dies wird auch beibehalten, wenn der Muskel einen oder mehrere Podomere durchzieht und so Insertion und Ursprung nicht in benachbarten Podomeren liegen. Die drei Beinpaare scheinen in allen untersuchten Arten sehr ähnlich aufgebaut. Die Detailanalyse erfolgte daher nur am mesothorakalen Bein. Da das thorakale Exoskelett nicht untersucht wurde, wird die extrinsische Coxal-Muskulatur hier nicht beschrieben.

Coxa

Übereinstimmende Muster: In allen untersuchten Arten artikuliert die Coxa mit der Ventralseite am Sternit (siehe Abb. 10: f). Ventral und ventrolateral ist die coxale Kutikula von der Sternit-Coxa-Verbindung bis zur Coxa-Trochanter-Verbindung dick und stark sklerotisiert. Dorsal ist nur ein schmaler Bogen sklerotisiert, der die anterioren und posterioren lateralen Seite verbindet. Eine dorsale Artikulation mit dem Thorax ist nicht vorhanden (siehe Abb. 10: e). Vermutlich bilden weichhäutige Strukturen hier eine gelenkähnliche Verbindung.

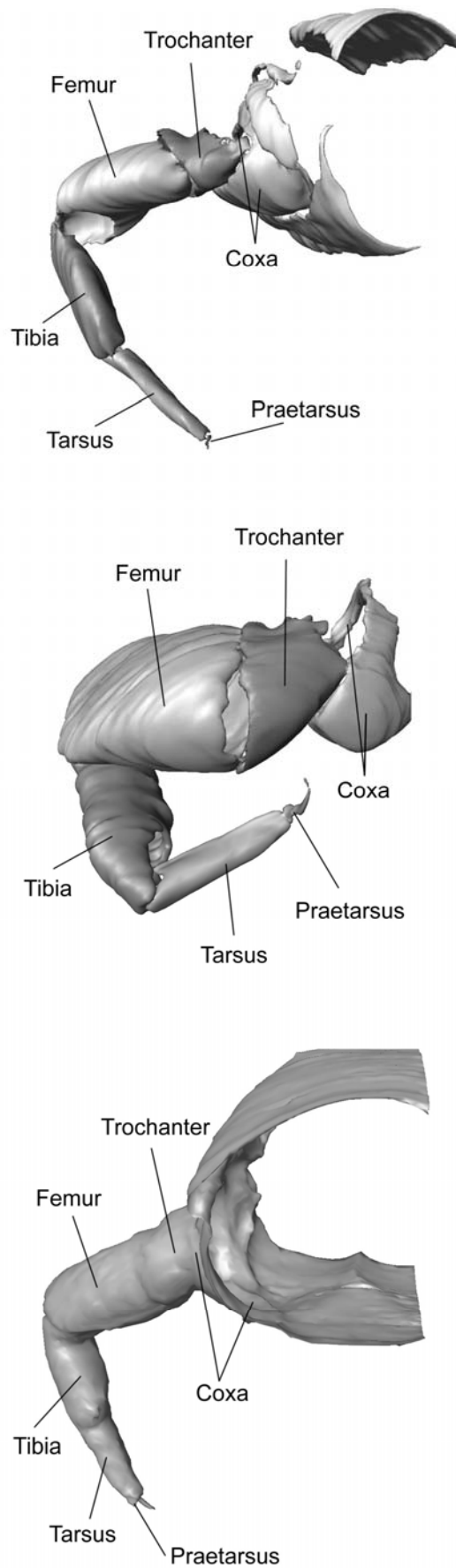


Abb. 9: Podomere des mesothorakalen Diplurenbeines von anterior gesehen. Rekonstruktion der stark sklerotisierten Kutikula-Anteile (A und B) bzw. Rekonstruktion der Oberfläche (C). A: *Campodea*; B: *Catajapyx*; C: *Octostigma*

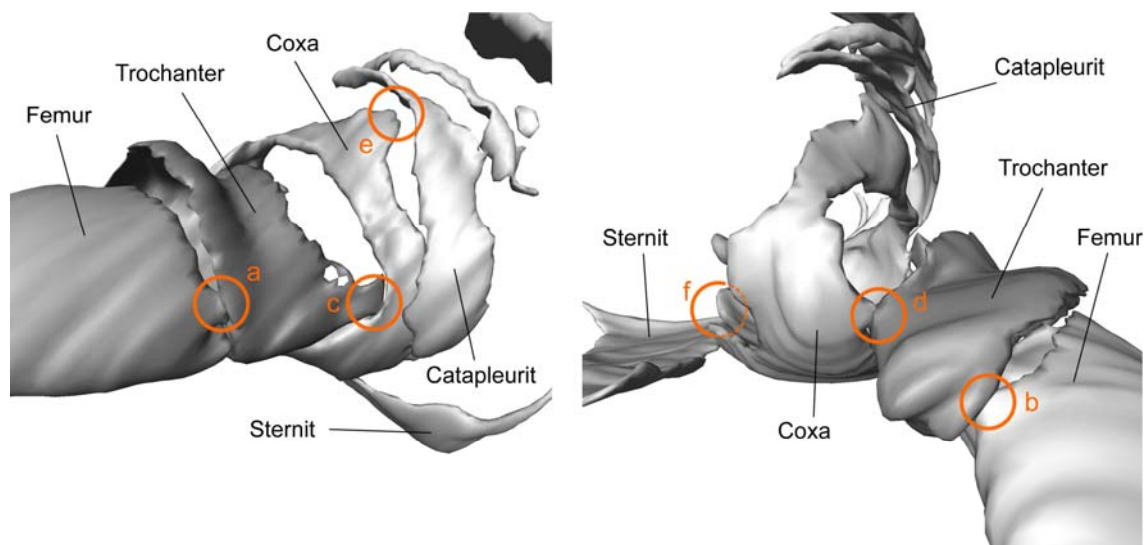


Abb. 10: Artikulationen im proximalem Bereich des Campodea-Beines. Links: Blick von anterior; rechts: Blick von posterior; a und b: Trochanter-Femur-Gelenk; c und d: Coxa-Trochanter-Gelenk; e und f: Thorax-Coxa-Gelenk.

Region des Coxa-Trochanter-Gelenks

Übereinstimmende Muster (siehe Abb. 12): Das dicondyle Coxa-Trochanter-Gelenk besitzt eine anteriore und eine posteriore Verbindung. Dorsal und vor allem ventral sind die Ränder der Podomere durch breite Gelenkmembranen getrennt. Bei allen drei Arten sind zwei Bindegewebs-Strukturen vorhanden, die dem Trochanter zugeordnet werden können. (i) Die Trochantersehne (**T:tr/da-tr/dp**) liegt im dorsalen und proximalen Bereich des Trochanters und kreuzt das Lumen von der anterioren zur posterioren Wand. (ii) Auf der Ventralseite zieht ebenfalls proximal ein Bindegewebs-Septum (**T:tr/va-tr/vp**) ins Trochanterlumen. Es ist von anterior nach posterior über fast die ganze Länge mit der Kutikula verbunden.

An diesen beiden Strukturen inserieren Trochantermuskeln, gleichzeitig entspringen an der gegenüberliegenden Seite femorale Muskeln (siehe Abb. 11).

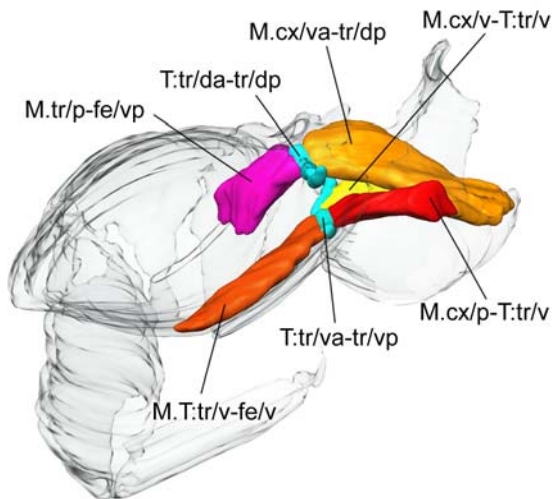


Abb. 11: Bindegewebsstrukturen (blau) des Coxa-Trochanter-Gelenks bei *Catajapyx*, mit gegenüberliegenden Ursprungs- und Insertionsstellen der Muskeln.

An der gesamten ventralen Oberfläche der distalen Coxa entspringen Muskelbündel, die in Schichten zu zwei unterschiedlichen Insertionsstellen ziehen. Die am weitesten ventral gelegenen Bündel (**M.cx/v-T:tr/vv**) inserieren mit einer breiten Sehne (**T:tr/vv**) an der ventralen Trochanterbasis. Eine variierende Anzahl von dorsaler liegenden Bündel (**M.cx/v-T:tr/v**) inserieren am ventralen Bindegewebs-Septum (**T:tr/va-tr/vp**). Bei allen untersuchten Arten ziehen zwei Muskeln von der ventralen Basis der Coxa schräg zu den Insertionsstellen. Ein Muskel (**M.cx/va-tr/dp**) inseriert an der dorsalen Trochanterwand und zugleich am posterioren Ende der Trochantersehne, nahe dem Ursprung von Muskel **M.tr/p-fe/vp** (siehe auch Abb. 11). Der zweite Muskel (**M.cx/va-tr/da**) inseriert an der anterioren dorsalen Trochanterbasis.

Variierende Muster (siehe Abb. 12): Bei *Campodea* entspringt ein Trochantermuskel am Endoskeletton (**M.end-T:tr/va**). Es ist der einzige Muskel, der bei den Dipluren nicht an der Coxa inseriert. Dieser Muskel inseriert am anterioren Teil des ventralen Septums (**T:tr/va-tr/vp**) gegenüber dem Ursprung von **M.T:tr/v-fe/v**. Ein Muskel mit übereinstimmender Insertion hat bei *Catajapyx* und *Octostigma* seinen Ursprung an der posterioren Coxa-Basis (**M.cx/p-T:tr/v**). Dieser könnte aber ebenso als der anteriorste Teil von **M.cx/v-T:tr/v** betrachtet werden.

Der größte Anteil der ventralen Muskelbündel inseriert bei *Campodea* am ventralen Bindegewebs-Septum (**T:tr/va-tr/vp**). Dem gegenüber inserieren die meisten ventralen Bündel bei *Catajapyx* und *Octostigma* an der breiten Sehne der ventralen Trochanterbasis (**T:tr/vv**).

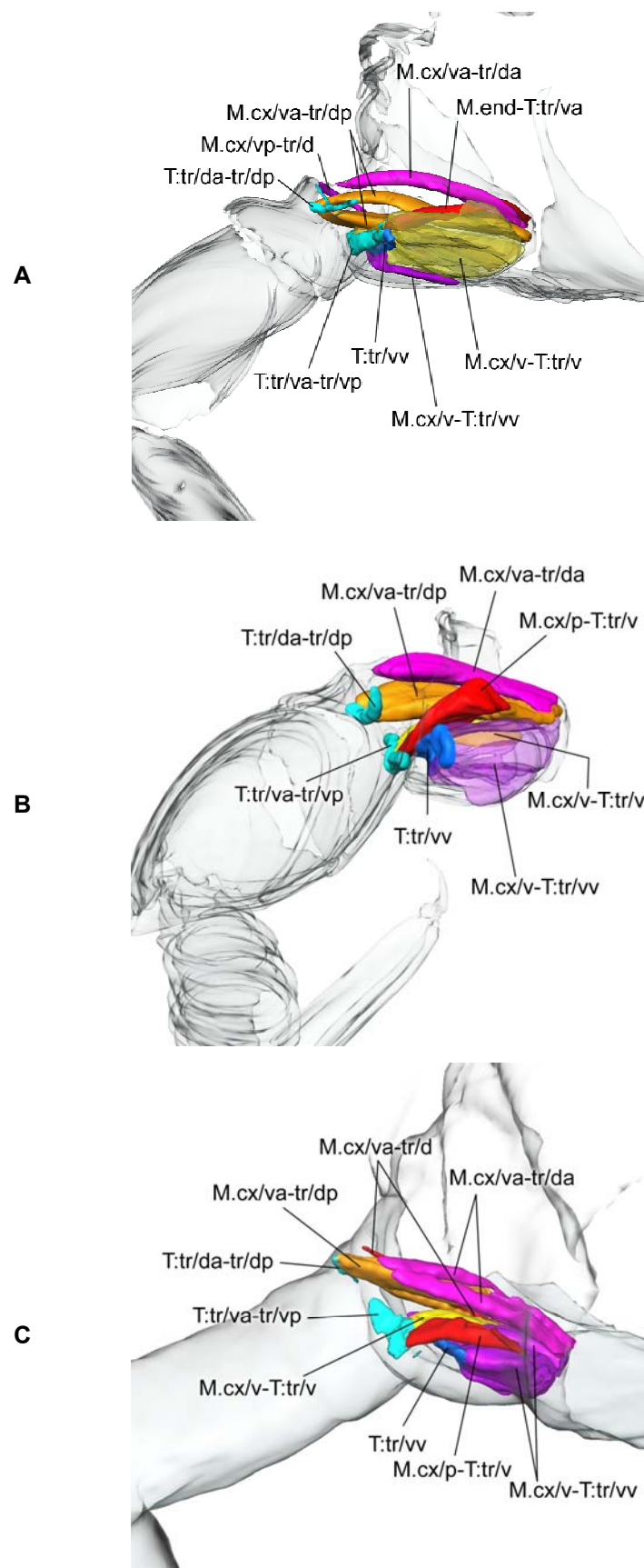


Abb. 12: Region des Coxa-Trochanter-Gelenks (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Cataglyphis*; C: *Octostigma*

Ein zusätzlicher Trochantermuskel (**M.cx/vp-tr/d**) ist bei *Campodea* vorhanden. Dieser entspringt in der Mitte der ventralen Coxa, läuft fast horizontal, und inseriert an der Trochanterbasis in unmittelbarer Nähe zu **M.cx/va-tr/d**.

Trochanter

Der kurze, zylindrische Trochanter hat wegen seiner konkaven Dorsalseite die Form eines Sattels. Zwei Bindegewebestrukturen erstrecken sich von der anterioren zur posterioren Kutikula-Oberfläche. Die Trochantersehne (**T:tr/da-tr/dp**) kreuzt das Trochanterlumen an der Dorsalseite. Der ventralen Kutikula-Fläche entlang streckt sich ein Bindegewebs-Septum (**T:tr/va-tr/vp**) ins Trochanterlumen.

Die Region des Trochanter-Femur-Gelenks

Übereinstimmende Muster (siehe Abb. 13): Das Trochanter-Femur-Gelenk ist mono- oder dicondyl (siehe variierende Muster).

In allen untersuchten Arten inserieren vier Muskeln am Femur. Ein Muskel (**M.tr/p-fe/vp**) entspringt an der posterioren dorsalen Wand des Trochanters, in unmittelbarer Nähe zur Trochantersehne (**T:tr/da-tr/dp**) und inseriert an der posterioren ventralen Wand des Femur. Ein zweiter Muskel (**M.tr/p-fe/v**) mit benachbarter Ursprungsstelle inseriert aber im Unterschied zum vorhergehenden an der ventralen Basis des Femur. Der dritte Muskel (**M.T:tr/v-fe/v**) entspringt in zwei bis drei Bündel am ventralen Trochanterseptum (**T:tr/va-tr/vp**) und an der ventralen Wand des Trochanters. Er inseriert an der ventralen bis ventrolateralen Femurbasis. Der vierte Muskel (**M.cx-fe/d**) ist der einzige, der an der Basis der Coxa entspringt. Er zieht an der Trochantersehne vorbei und inseriert an der dorsalen Basis des Femur.

Variierende Muster (siehe Abb. 13):

Die dicondyle Trochanter-Femur-Artikulation von *Catajapyx* und *Octostigma* ist durch ein starkes anteriores Gelenk und ein unauffälliges posteriores Gelenk charakterisiert. Bei *Campodea* ist hingegen nur eine monocondyle Artikulation mit einem anterioren Gelenk vorhanden. Dieses ist kein einfaches Drehgelenk wie bei *Catajapyx*, sondern es kommunizieren zwei Zähne des anterioren Femur-Apodems mit einer entsprechenden Struktur am Trochanter-Rand.

Am Muskelsystem des Trochanter-Femur-Gelenks konnten bei den untersuchten Arten nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Der Muskel **M.tr/p-fe/vp** inseriert bei *Campodea* nicht nur an der ventralen Wand des proximalen Femur, sondern auch an der ventralen Basis. Diese beiden Bündel (**M1.tr/p-fe/vp** und **M2.tr/p-fe/vp**) könnten auch als separate Muskeln interpretiert werden.

Femur

Der keulenförmige Femur ist bei allen drei Arten lateral etwas abgeflacht. Distal ist die Oberfläche im ventralen Bereich schwach sklerotisiert und formt eine buchtartige Ausnehmung für die Gelenksmembran der Femur-Tibia-Artikulation.

Die Region des Femur-Tibia-Gelenks

Übereinstimmende Muster: Femur und Tibia artikulieren an der dorsalen Seite des Beines. Diese Artikulation ist eine komplexe Konstruktion, die aus einem distalen femoralen Processus (**W:fe**), sowie einem Processus (**Z:ti**) und einer Schulter (**Y:ti**) der proximalen Tibia aufgebaut ist (siehe Abb. 14 und Abb. 15). Der femorale Processus entspringt an der dorsalen, anterioren Seite des distalen Femur. Leicht gebogen zieht er horizontal nach posterior und kommuniziert mit der Einbuchtung der Tibia-Schulter.

Die stark gefaltete Gelenksmembran verbindet den Tibial-Processus zur distalen Grenze und erlaubt, wenn das Knie ausgestreckt ist, dass der tibiale Processus (**Z:ti**) im Raum zwischen dem femoralen Processus (**W:fe**) und der dorsalen Grenze des Femur eingestülpt ist. In allen drei Arten können drei Muskelkomplexe unterschieden werden. Zwei von diesen inserieren an der anterioren bzw. an der posterioren Seite über je eine Sehne an der dorsalen Tibiabasis. Ein dritter Komplex hat entweder zwei unmittelbar benachbarte Insertionsstellen oder ist über eine einzelne Sehne mit der ventralen Basis der Tibias verbunden (siehe Abb. 16).

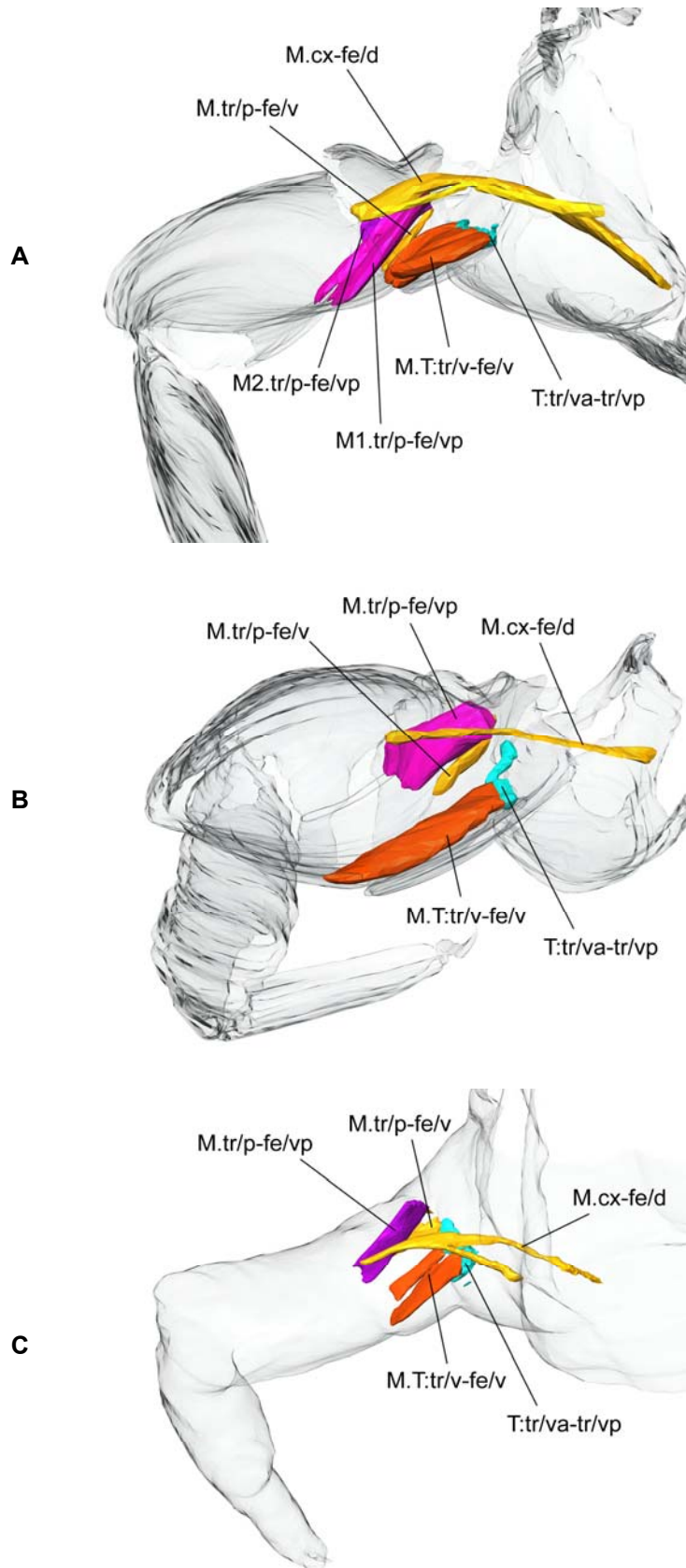


Abb. 13: Trochanter-Femur-Gelenk (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Catajapyx*; C: *Octostigma*

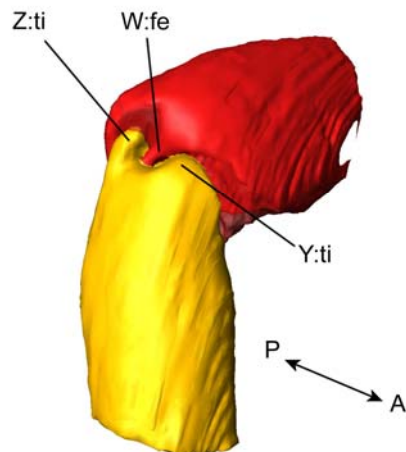


Abb. 14: Detailrekonstruktion des Femur-Tibia-Gelenks von *Octostigma*: mit distalem femoralem Processus (W:fe) sowie einem tibialen Processus (Z:ti) und einer tibialen Schulter (Y:ti). P: posterior; A: anterior. Weichhäutige Strukturen sind transparent dargestellt.

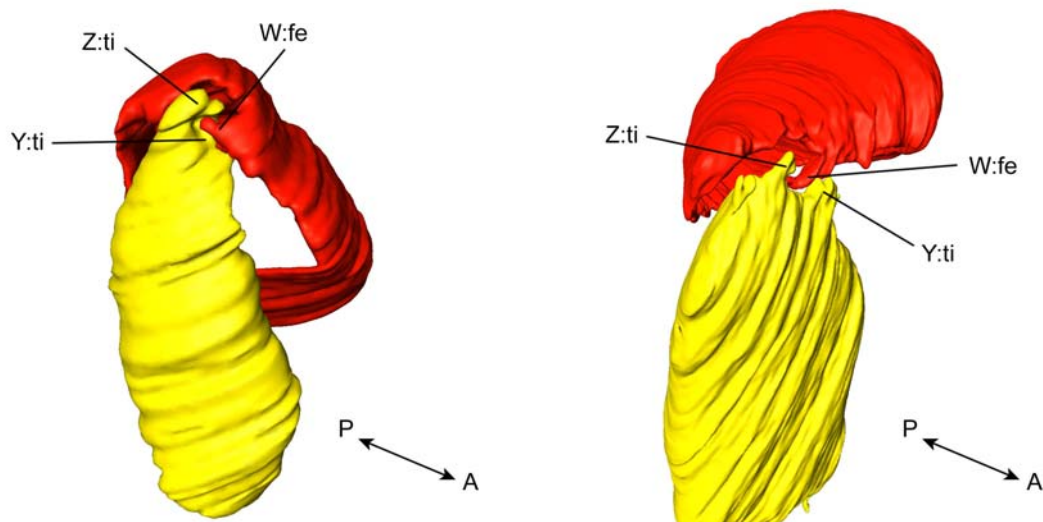


Abb. 15: Femur-Tibia-Gelenk von *Campodea* (links) und *Catajapyx* (rechts): mit distalem femoralem Processus (W:fe) sowie einem tibialen Processus (Z:ti) und einer tibialen Schulter (Y:ti). P: posterior; A: anterior.

Eine Sehne (**T:ti/dp**) setzt an der dorsalen posterioren Seite am Processus **Z:ti** der Tibia an. Drei Muskelteile, die an unterschiedlichen Podomeren entspringen, inserieren hier (siehe Abb. 16). Ein Teil der Muskeln (**M.cx-T:ti/dp**) entspringt an der Coxa, zieht an der Trochantersehne vorbei und inseriert über die erwähnte Sehne **T:ti/dp** am Processus **Z:ti**. Ein zweiter Muskel (**M.tr/d-T:ti/dp**) hat seinen Ursprung am dorsalen Bereich des Trochanter. Einige Bündel von **M.fe/d-T:ti/dp**, die an der dorsalen Fläche des Femur entspringen, bilden den dritten Teil.

Am dorsalen anterioren Bereich inseriert eine zweite Sehne (**T:ti/da**) an der Tibiabasis. Zwei bis drei Muskelteile (siehe Variierende Muster) mit unterschiedlichem Ursprung sind mit dieser Sehne verbunden (siehe Abb. 18). Ein kleiner Teil (**M1.fe/d-T:ti/da**) entspringt im dorsalen Bereich in der Mitte des Femur, während ein zweiter, größerer Teil mit vielen Bündeln am dorsalen und proximalen Bereich des Femur entspringt.

In allen untersuchten Arten inserieren zwei Muskeln an der Ventralseite der Tibia. Ein Muskel (**M.fe-ti/v**) entspringt in vielen Bündeln an der ventralen Basis des Femur. Ein zweiter Muskel (**M.tr-ti/v**) entspringt in vielen Bündeln an der dorsalen Wand des Trochanter. Diese beiden Muskeln inserieren entweder mit einer einzelnen gemeinsamen Sehne (*Campodea*) oder haben zwei getrennten Insertionsstellen (*Catajapyx* and *Octostigma*) (siehe Variierende Muster und Abb. 19).

Variierende Muster:

Sowohl bei *Catajapyx* als auch bei *Octostigma* inseriert ein Muskel (**M.tr/ad-T:ti/da**) über die gemeinsame Sehne **T:ti/da** an der dorsalen, anterioren Tibia-Basis und entspringt an der anterioren, dorsalen Fläche in der Mitte des Trochanter. Solch ein Muskel fehlt bei *Campodea*, jedoch entspricht der Ursprung des einzigartigen tarsalen Muskels (**M.tr/ad-ta/v**) mit dem Ursprung von **M.tr/ad-T:ti/da** bei *Catajapyx* und *Octostigma*.

Bei *Campodea* stehen alle Teile von beiden ventralen Muskeln (**M.fe-ti/v** und **M.tr-ti/v**) mit der gemeinsamen ventralen Sehne (**T:ti/v**) in Verbindung. Hingegen existieren bei *Catajapyx* und *Octostigma* zwei nahe stehende, aber getrennte Sehnen, an denen diese beiden Muskeln inserieren. Die Sehne des Muskels **M.fe-T:ti/va** inseriert etwas anterior der Sehne von Muskel **M.tr-T:ti/vp**. Bei *Octostigma* inseriert möglicherweise ein Bündel von **M.tr-T:ti/vp** an der benachbarten Sehne **T:ti/va**.

Ein Bündel femoralen Ursprungs (**M.fe-T:ti/vp**) setzt interessanterweise bei *Catajapyx* an der posterioren Sehne (**T:ti/dp**) an.

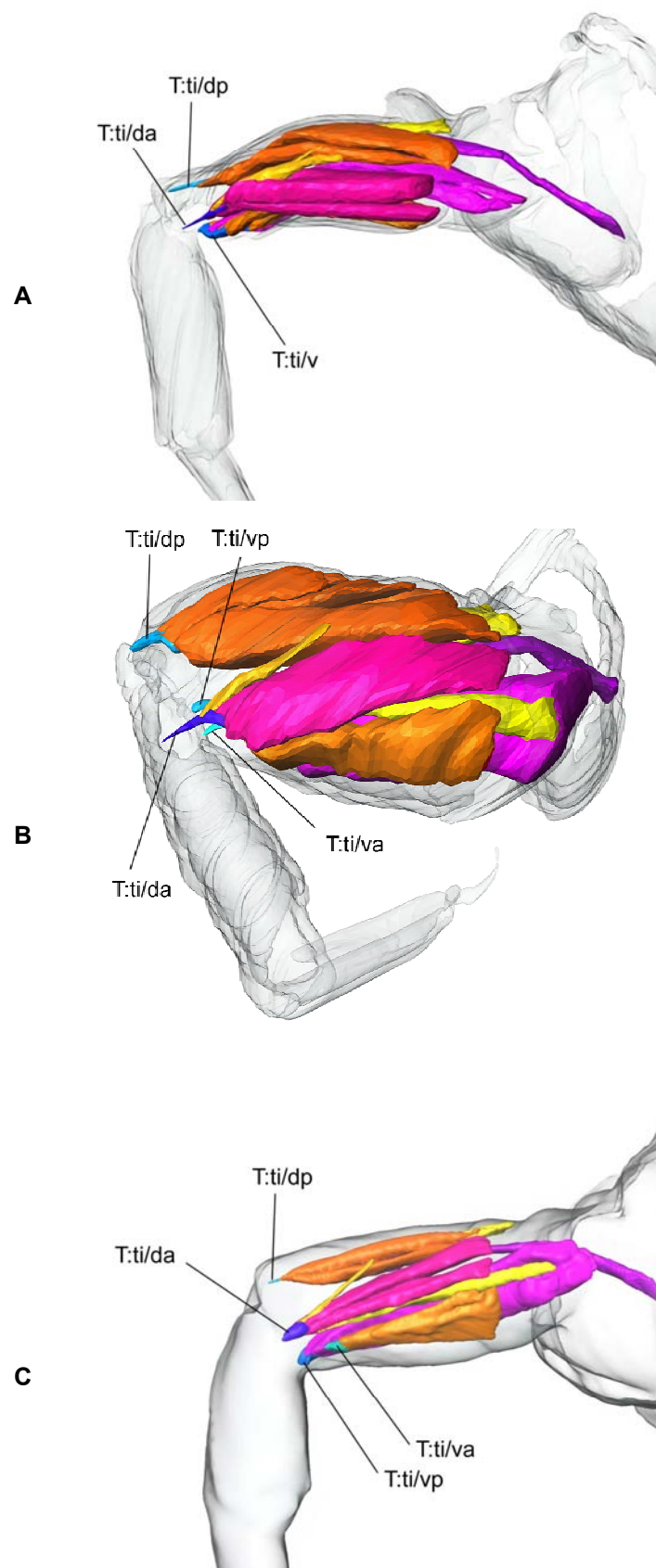
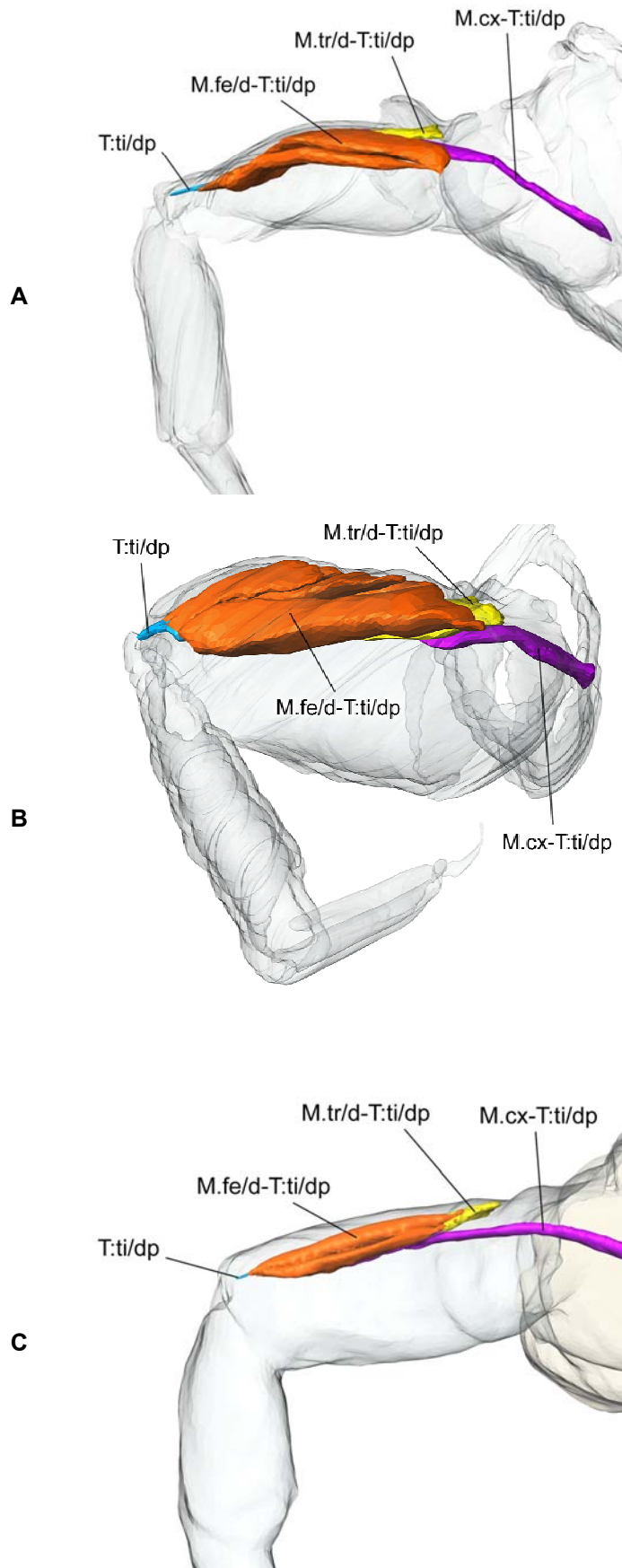


Abb. 16: Übersicht der Insertionen und Muskeln des Femur-Tibia-Gelenks (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Cataglyphis*; C: *Octostigma*



**Abb. 17: Dorsale posteriore Insertionsstelle des Femur-Tibia-Gelenks (Blickrichtung von anterior).
A: *Campodea*; B: *Catajapyx*; C: *Octostigma***

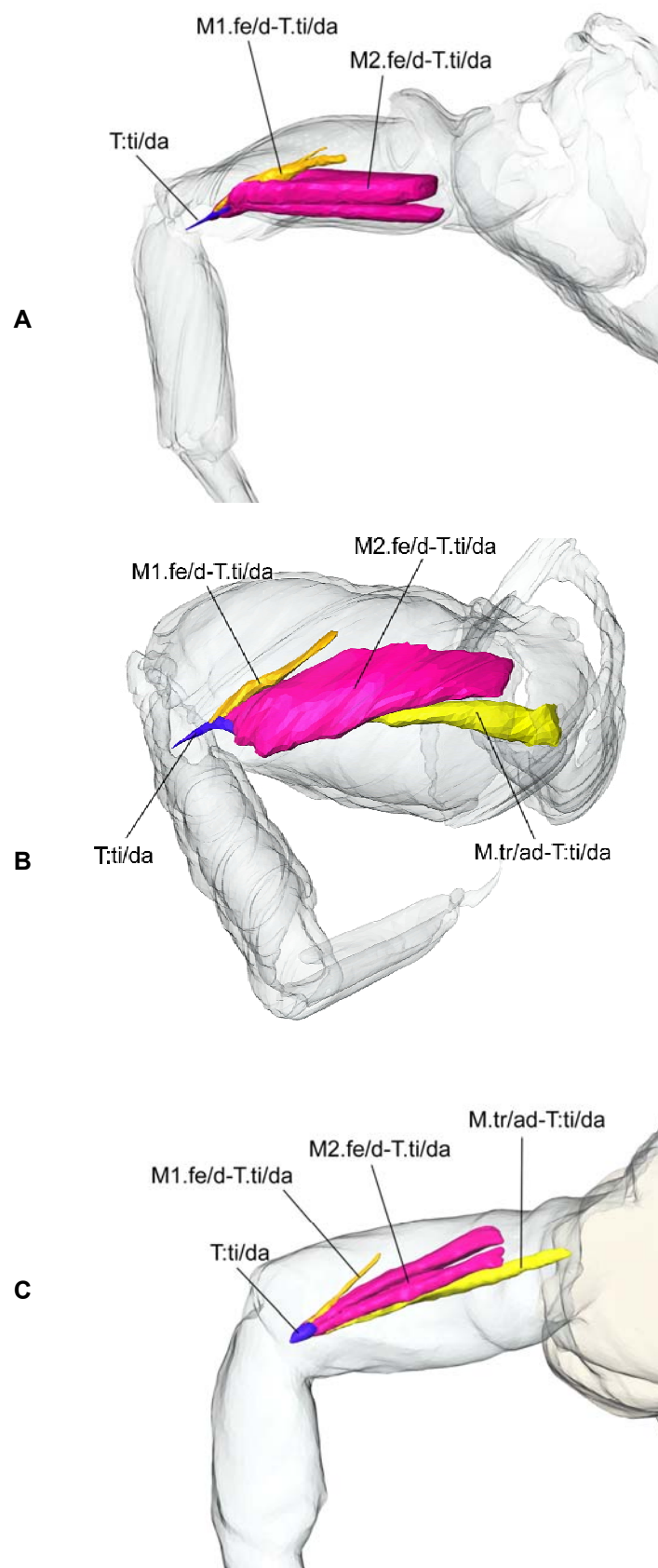


Abb. 18: Dorsale anteriore Insertionsstelle des Femur-Tibia-Gelenks (Blickrichtung von anterior).
A: *Campodea*; B: *Catagapyx*; C: *Octostigma*

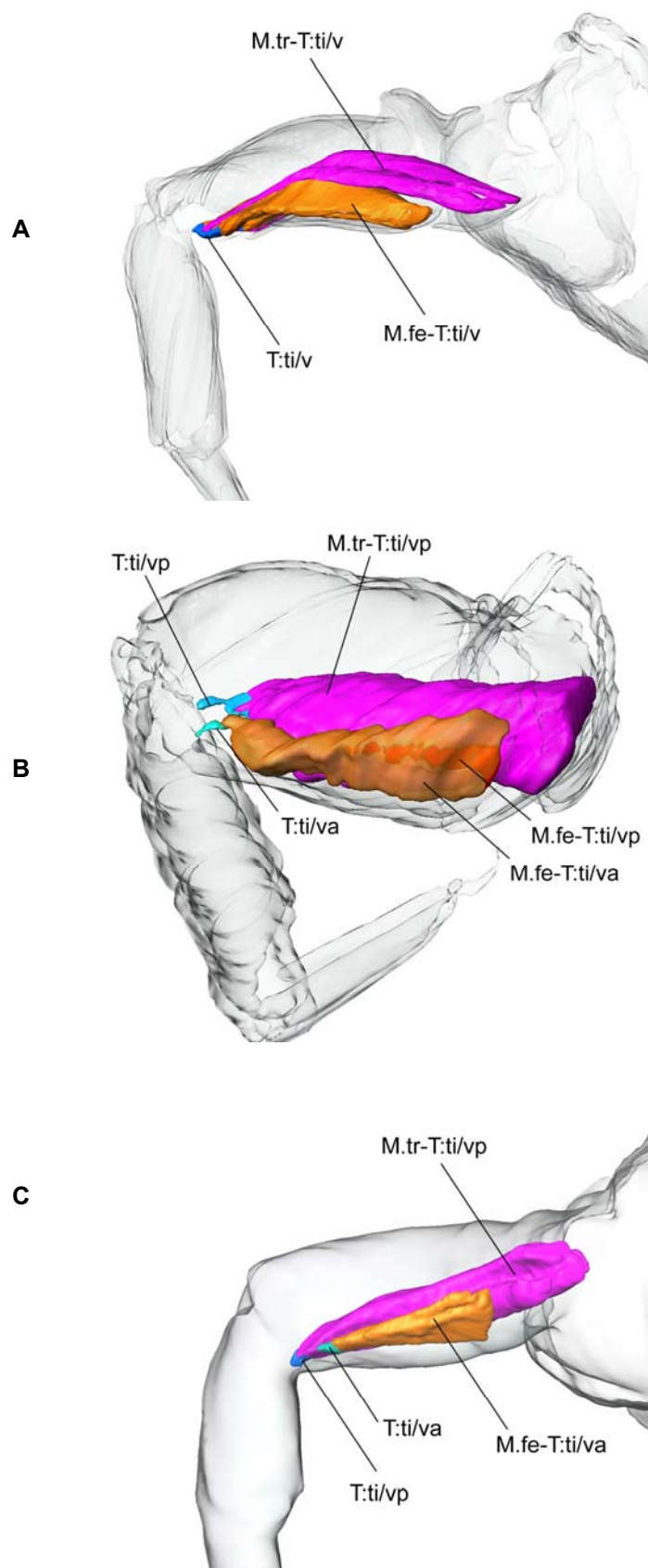


Abb. 19: Ventrale Insertionsstelle des Femur-Tibia-Gelenks (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Cataglyphis*; C: *Octostigma*

Tibia

Bei allen untersuchten Arten ist die Tibia röhrenförmig gebaut.

Die Region des Tibia-Tarsus-Gelenks

Übereinstimmende Muster (siehe Abb. 22):

Einige Bündel (**M.ti/dp-T:ta/pv**) entspringen am posterioren dorsalen Bereich und sind mit einer kurzen gemeinsamen Sehne (**T:ta/pv**) mit der lateroventralen (posterior) Tarsus-Basis verbunden. Bei allen drei Arten inseriert ein zweiter Muskel an der ventralen Tarsus-Basis, der Ursprung des Muskels variiert bei den Dipluren (siehe Variierende Muster).

Variierende Muster (siehe Abb. 22):

Das Gelenk ist bei *Octostigma* funktionell ein dorsal gelegenes Scharniergelenk. Durch eine lang gezogene, leicht gebogene tarsale Schulter (**Y:ta**) und einen ebenfalls in die Länge gezogenen und leicht gebogenen tarsalen Processus (**Z:ta**) wird eine Rinne gebildet, die wiederum mit einem in die Länge gezogenen, leicht gebogenen tibialen Kopf (**W:ti**) kommuniziert (siehe Abb. 20). Beim Abbiegen des Gelenkes wird der ventrale Teil des Tarsus in die Tibia eingestülpt.

Tibia und Tarsus artikulieren bei *Campodea* hingegen über ein an der Dorsalseite des Beines gelegenes, kurzes, vermutlich monocondyles Gelenk (siehe Abb. 21).

Für *Catajapyx* konnten aus technischen Gründen keine eindeutigen Ergebnisse für dieses Gelenk erarbeitet werden.

Bei *Octostigma* und *Catajapyx* inseriert der Muskel (**M.ti/v-ta/v**) an der ventralen Tibia-Basis und entspringt am ventralen Bereich der Tibia. Mit der gleichen Insertion entspringt bei *Campodea* ein Muskel (**M.tr/ad-ta/v**) an der dorsalen Wand des Trochanter und passiert die komplette Länge von Femur und Tibia bevor er an der ventralen Basis des Tarsus ansetzt. Der Ursprung dieses Muskels ist nahe dem Ursprung des trochanteralen Teils des ventralen Tibia-Muskels **M.tr/ad-T:ti/v**.

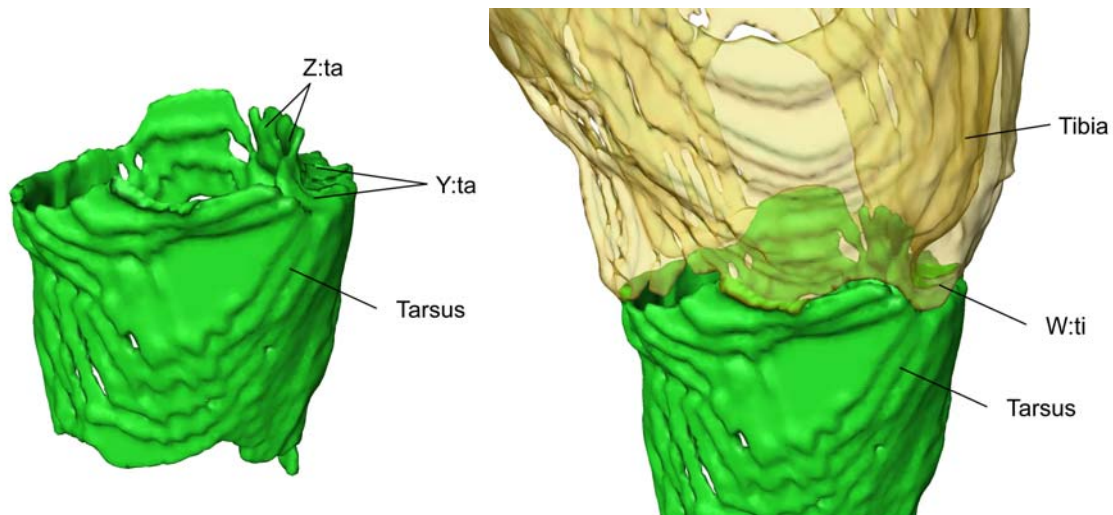


Abb. 20: Detailrekonstruktion des Tibia-Tarsus-Gelenks von *Octostigma* (Ansicht von posterior)

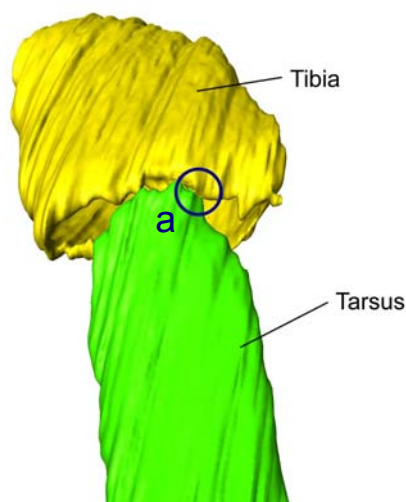


Abb. 21: Tibia-Tarsus-Gelenk (a) von *Campodea* (Ansicht von dorsal).

Als einzige der untersuchten Arten können bei *Catajapyx* drei tarsale Muskeln beobachtet werden. Getrennt von **M.ti/dp-T:ta/pv** und **M.ti/v-ta/v** setzt ein weiterer Muskel (**M.ti/d-ta/d**) am dorsalen Gelenksbereich an. Dieser Muskel entspringt dem dorsalen Bereich der proximalen Tibia.

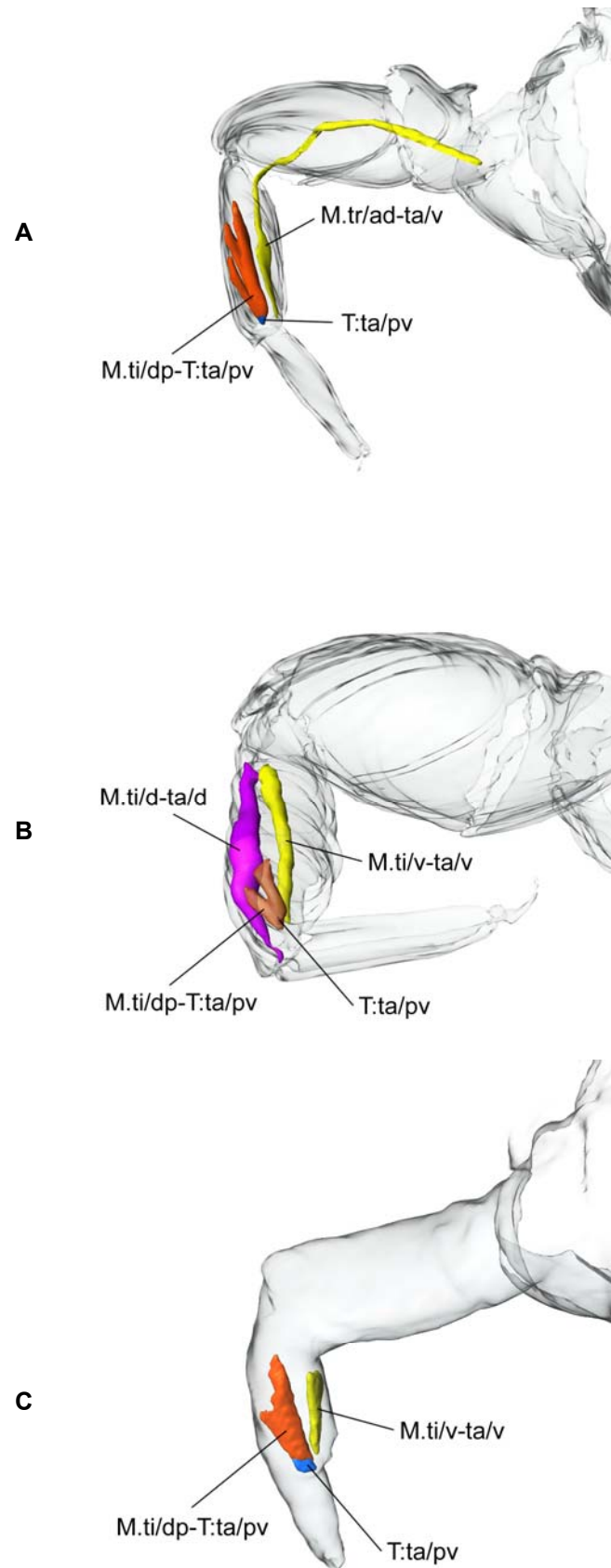


Abb. 22: Muskulatur der Region des Tibia-Tarsus -Gelenks (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Catajapyx* (Muskel M.ti/dp-T:ta/pv halbtransparent dargestellt); C: *Octostigma*

Tarsus

Der Tarsus ist bei allen drei untersuchten Arten eine lange, dünne Röhre, die zur Spitze des Beines leicht verjüngt ist. Der Querschnitt ähnelt der Tibia, jedoch ist der Durchmesser kleiner.

Die Region des Tarsus-Pretarsus-Gelenks

Übereinstimmende Muster (siehe Abb. 23): An der Dorsalseite bildet ein monocondyles Gelenk die sklerotisierte Verbindung zwischen Tarsus und Pretarsus. Eine breite, stark kutikularisierte Ausbuchtung des Tarsus kommuniziert sowohl mit der pretarsalen Basis als auch mit dem basalen Vorsprung der Klaue. Über den Rest des Umfangs sind die Podomere durch eine Gelenksmembran getrennt, die auf der Ventralseite des Beines ihre maximale Breite hat. Der Pretarsus kann ventral in die kutikuläre Röhre des Tarsus eingestülpt werden, da der Durchmesser des Pretarsus kleiner ist als der des distalen Tarsus.

An der Ventralseite inseriert die pretarsale Sehne (**T:pr/v**) an der Pretarsus-Basis. Sowohl von der Tibia (**M.ti/-T:pr/v**) als auch vom Femur (**M.fe/-T:pr/v**) ausgehende Muskeln setzen mit einer variierenden Anzahl an Bündel an der pretarsalen Sehne an. Bei allen untersuchten Dipluren entspringen einige Bündel an der dorsolateralen Fläche der proximalen Tibia (**M.ti/d-T:pr/v**). Sie sind ungefähr an der Höhe der Tibia-Tarsus-Verbindung mit der Sehne **T:pr/v** verbunden. Ein Bündel (**M.fe/da-T:pr/v**), das von der dorsalen Fläche des distalen Femur ausgeht und anterior der dorsalen Tibiasehne (**T:ti/dp**) vorbeizieht, bevor es an der Sehne **T:pr/v** ansetzt, ist ebenfalls in allen untersuchten Arten vorhanden.

Variierende Muster (siehe Abb. 23): Bei *Campodea* und *Catajapyx* entspringen einige Muskelbündel (**M.ti/v-T:pr/v**) an der ventrolateralen Fläche der Tibia und setzen an der Sehne (**T:pr/v**) in der Mitte der Tibia an. Bei *Octostigma* konnten hingegen keine Muskelbündel, die der ventralen bzw. ventrolateralen Fläche entspringen, gefunden werden. Bei *Campodea* und *Octostigma* können zwei Muskelteile femoralen Ursprungs beschrieben werden. Klar abgegrenzt vom einzelnen Bündel **M.fe/da-T:pr/v** (das bei allen drei Arten vorhanden ist), sind eine Reihe von Bündel (**M.fe/dp-T:pr/v**) vorhanden, die an der dorsalen Fläche des Femur entspringen und posterior die Tibia-Sehne **T:ti/dp** passieren. Solche Bündel existieren bei *Catajapyx* nicht.

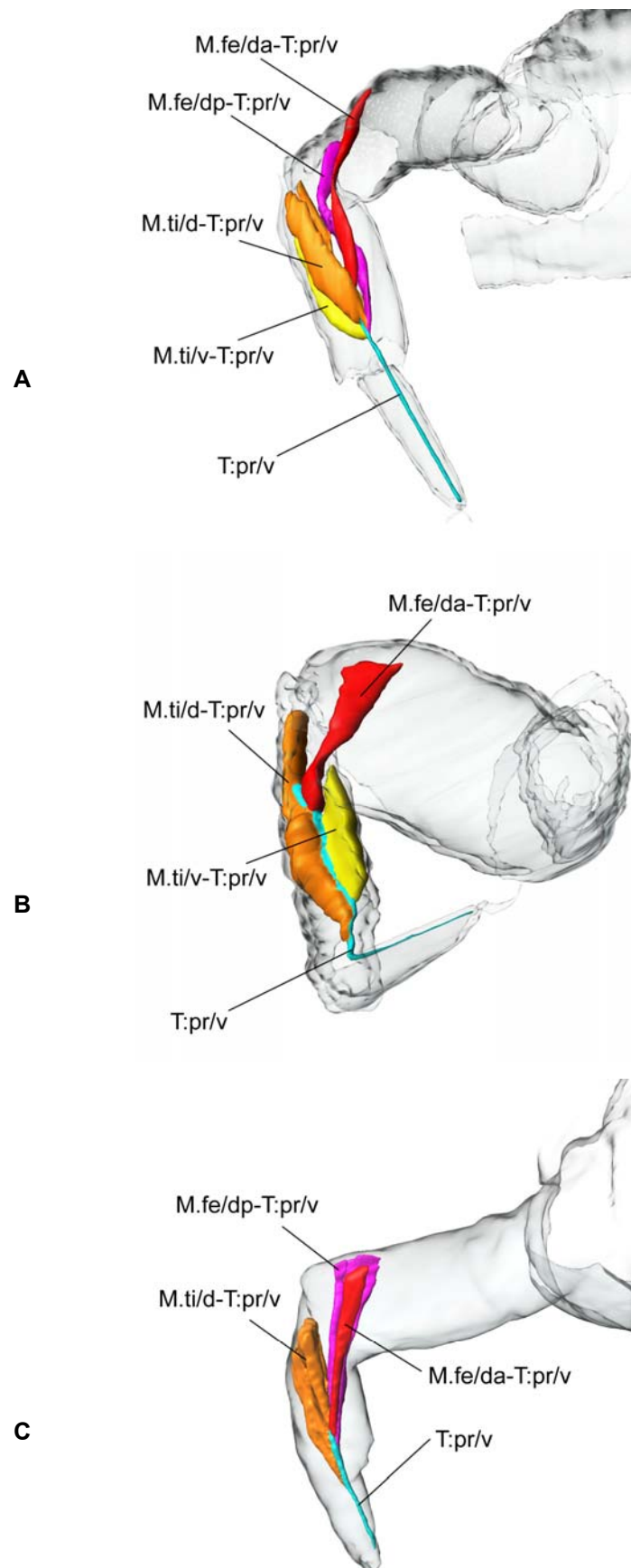


Abb. 23: Muskulatur der Region des Tarsus-Pretarsus-Gelenks (Blickrichtung von anterior). A: *Campodea*; B: *Catajapyx*; C: *Octostigma*

Pretarsus und Pretarsus-Klaue

Übereinstimmende Muster: Der Pretarsus hat bei allen drei untersuchten Arten die Form eines hohlen Kegels. Mit Ausnahme von kleinen membranösen Feldern ist der Kegel stark sklerotisiert. Alle drei untersuchten Arten besaßen zwei dorsolateral liegende Klauen.

3.2 3D-Rekonstruktion

Virtuelle Schnitte

Sobald die Daten dreidimensional vorliegen (bei Semidünnschnitten nach dem Alinieren), können sofort Schnittebenen in jeder beliebigen Richtung angelegt und verschoben werden. Dies ist noch keine 3D-Rekonstruktion, aber der Betrachter erhält schnell eine räumliche Vorstellung der zu untersuchenden Objekte (siehe Abb. 24).

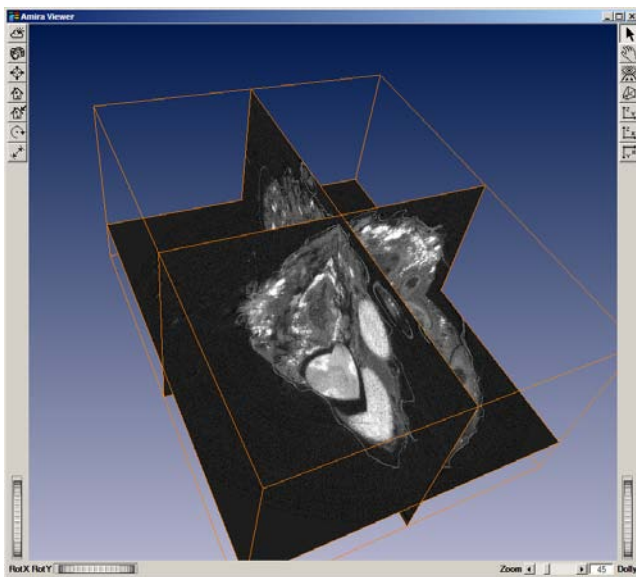


Abb. 24: Austrogllyphus sp., virtuelle Schnitte; hier in 3 unterschiedlichen Ebenen

Volumengrafiken

Auch Volumengrafiken können relativ rasch erstellt werden. Dabei wird eine dreidimensionale Pixelwolke erzeugt, an der auch kontrastreiche innenliegende Strukturen erkennbar sind (siehe Abb. 25). Mit Semidünnschnittdaten werden bessere Ergebnisse erzielt, wenn vorher in einem Bildbearbeitungsprogramm der Kontrast erhöht und Artefakte beseitigt werden.

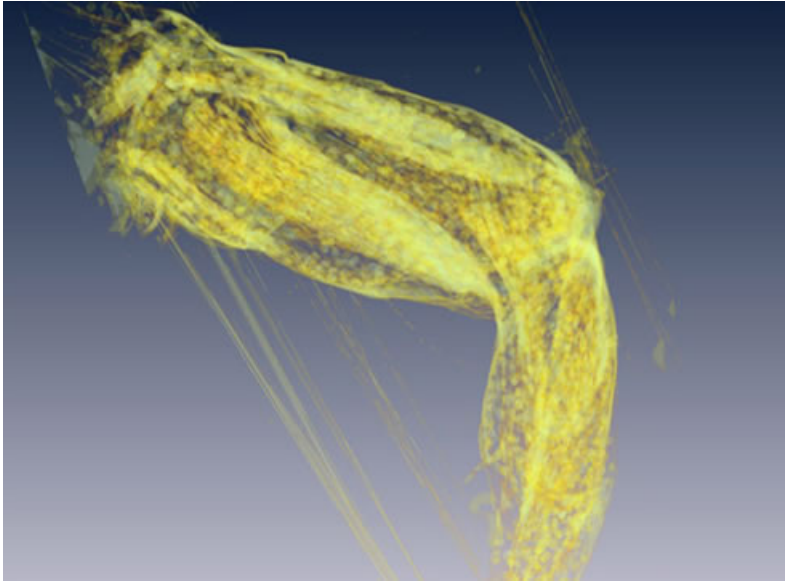


Abb. 25: Volumengrafik aus Semidünnschnitten von *Octostigma*: Erkennbar sind die Kutikula und einige Muskeln, aber auch Artefakte wie etwa Schneidescharten.

Isosurface

Anhand von Grauwertunterschieden kann mit Amira an einem beliebigen Grauwertbereich eine Grenze festgelegt und an diesem eine 3D-Fläche berechnet werden.

Mit den MCT-Daten konnten relativ schnell Oberflächenrekonstruktionen der Außenhülle durchgeführt werden (siehe Abb. 26).

Für innere Strukturen war das Isosurface-Tool nur geeignet, wenn der Kontrast ausreichend groß war. So konnten die Eier in den Ovarien von *Austroglyphus* sp. (siehe Abb. 27) gut visualisiert werden. Vor der MCT wurde das Tier mit Osmium fixiert und somit kontrastreichere Aufnahmen erzielt.

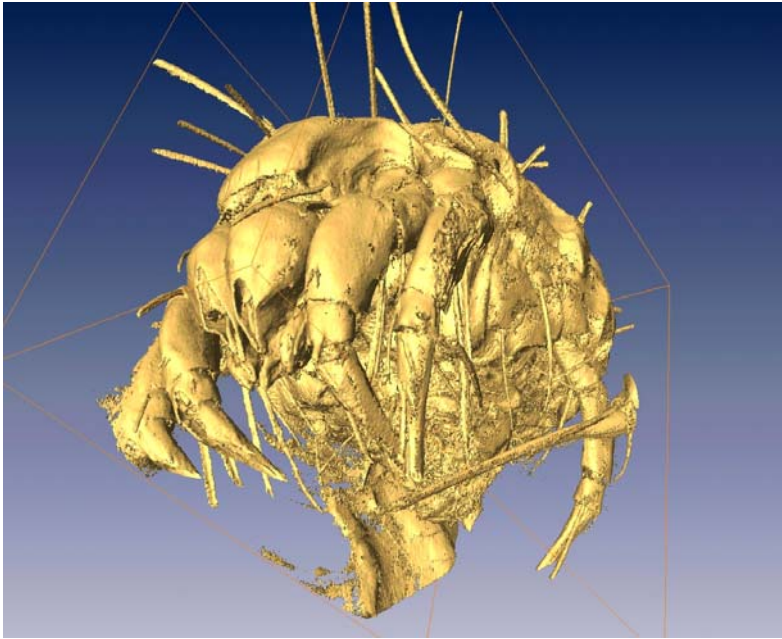


Abb. 26: Austroglyphus sp., 3D-Oberflächenrekonstruktionen (Isosurface) aus osmium-fixierten MCT-Daten

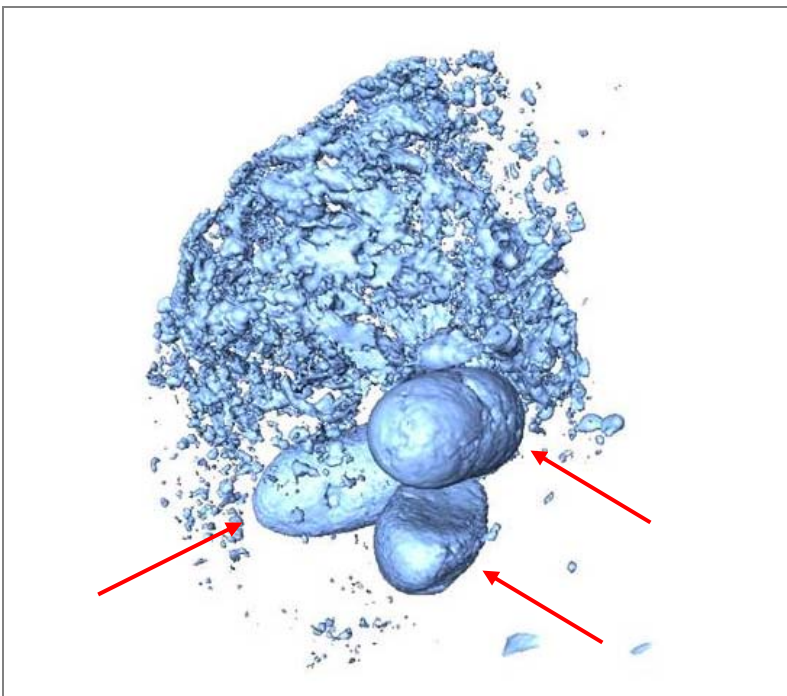


Abb. 27: Austroglyphus sp., 3D-Oberflächenrekonstruktionen (Isosurface) der Eier (durch Pfeile markiert) in Ovarien aus osmium-fixierten MCT-Daten

Isosurface aus Semidünnschnittdaten

Mit Semidünnschnitt-Daten konnte nur dann die Außenhülle automatisch rekonstruiert werden, wenn die Schnitte vorher entsprechend nachbearbeitet wurden. Für innere anatomische Strukturen konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden.

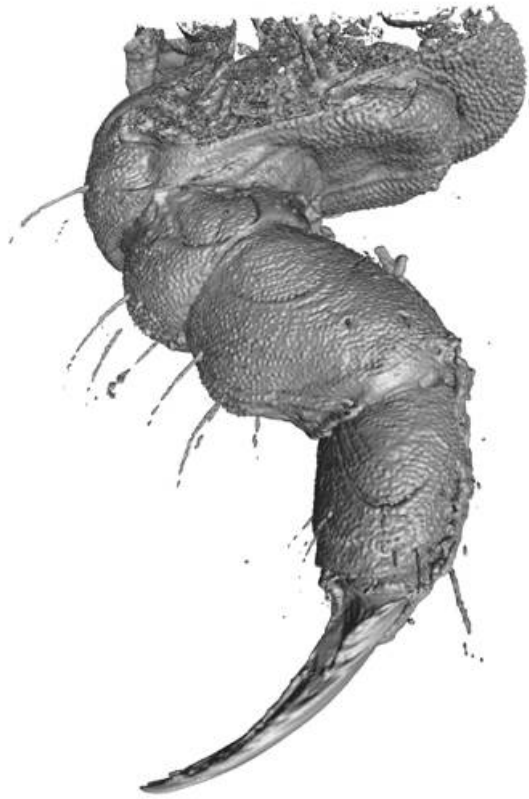


Abb. 28: Collembola: *Podura aquatica*, Isosurface aus Semidünnschnittdaten

Oberflächenvisualisierung mittels Image Segmentation

Um anatomische Strukturen wie z.B. das Muskelsystem darzustellen, ist das aufwendige Nachzeichnen einzelner Strukturen unumgänglich. Dies geschieht im Image Segmentation Editor. Dabei wird für jede einzelne Struktur, wie z.B. einen Muskel, ein eigenes Material festgelegt, und dieses Schnitt für Schnitt der nachgezeichneten anatomischen Struktur zugewiesen.

Aus den bei der Image Segmentation erstellten Strukturen werden dreidimensionale Oberflächen erzeugt. Nach diesem Schritt liegt das Ergebnis für den Betrachter räumlich vor, und einzelne Materialien können ein- und ausgeblendet, bzw. Transparenzeffekte zugewiesen werden. Durch die große Anzahl an Oberflächenpunkten stößt diese Ansicht aber an die Grenzen der Rechnerleistung, daher sollte

nachträglich die Oberfläche vereinfacht werden. Im Ergebnisteil des Skelettmuskelsystems (siehe Kapitel 3.1) sind eine Vielzahl von Abbildungen, die auf diese Weise erstellt wurden, zu sehen.

4 Diskussion

4.1 3D-Rekonstruktion

Alinierung

MCT-Daten liegen nach der Röntgenaufnahme sofort dreidimensional in einem Datensatz vor. Anders ist das hingegen bei Semidünnschnittserien. Hier müssen die einzelnen Schnitte erst in räumliche Beziehung zueinander gebracht (aliniert) werden. Amira stellt hierzu ein schnelles und sehr gut funktionierendes Tool zur Verfügung, den „Slice Aligner“. Damit kann sehr schnell eine automatische Alinierung durchgeführt werden, allerdings sollte das Ergebnis nachkontrolliert und teilweise händisch korrigiert werden. Jedenfalls kann mit diesem Tool im Vergleich zur händischen Alinierung mit einem Fotobearbeitungsprogramm, wie von Fanenbruck (2003) durchgeführt, erheblich Zeit eingespart werden.

Virtuelle Schnitte:

Virtuelle Schnitte sind dann von Vorteil, wenn der Autor Klarheit über gewisse räumliche Verhältnisse wünscht, sich der Aufwand einer 3D-Visualisierung aber nicht lohnt.

Um den Vergleich von Fotos oder Zeichnungen von Dünnschnitten aus der Literatur mit den 3D-Daten zu ermöglichen, kann ein Schnittwinkel und eine Schnittposition gewählt werden, die genau dieser Literaturabbildung entspricht.

Image Segmentation:

Oberflächenvisualisierung mittels Image Segmentation ist die genaueste, aber leider auch die zeitaufwendigste Methode, um einzelne Organe zu visualisieren. Auch relativ feine Organe können visualisiert werden, wenn die entstandene Oberfläche zur anschließenden Datenreduzierung nicht zu stark vereinfacht wird. Dies widerspricht teilweise der Behauptung von Fanenbruck (2003), dass feine und verzweigte Organe schwer zu visualisieren sind. Allerdings wurde von Fanenbruck nicht die Software Amira, sondern Surfdriver verwendet. Probleme wie Stauchung etc., die bei Semidünnschnitten anfallen, können neben der oben erwähnten Interpolation auch

umgangen werden, indem man in allen drei Raumebenen arbeitet. Die Image Segmentation kann also nicht nur in der Schnittebene, sondern auch in anderen Ebenen durchgeführt bzw. korrigiert werden.

Volumengrafiken:

Wesentlich rascher können Volumengrafiken (siehe Einleitung) erzeugt werden. Allerdings sind vor allem innenliegende Strukturen oft unzureichend erkennbar. Dazu müssen Semidünnschnittdaten vorher in einem Fotobearbeitungsprogramm invertiert werden (In der neuen Version Amira 4 besteht alternativ die Möglichkeit, den Hintergrund während des Aliniervorganges auf „weiß“ bzw. „hellgrau“ zu stellen). Wie auch von Haddad et al. (2004) beschrieben, eignet sich Volumengrafiken aber als schnelle Methode um einzelne Organe (durch Image Segmentation rekonstruiert) im Gesamtgefüge zu zeigen (siehe Abb. 29).

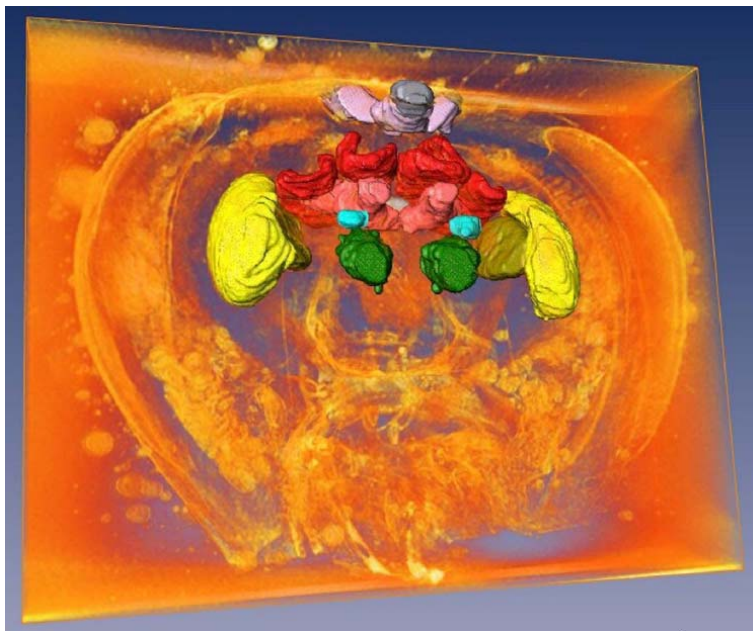


Abb. 29: Rekonstruktion des Honigbienen-Gehirns mittels Image Segmentation und Oberflächenvisualisierung. Um die Position im Kopf darzustellen wurde das rekonstruierte Gehirn in eine Voxelgrafik eingebettet (aus Haddad et al., 2004).

Eine wirkliche und vor allem schnelle Alternative zur Image Segmentation scheint der dreidimensionale Zauberstab zu sein. Zusammenhängende „Wolken“ von Pixeln bzw. Voxeln (z.B. einzelne Muskelzüge) werden dabei ausgewählt und als Einzelobjekte

segmentiert (siehe Abb. 30). Dies geschieht für jedes Objekt innerhalb weniger Sekunden, sofern die Strukturen gut voneinander getrennt sind (Fanenbruck, 2003). Leider wird der 3D-Zauberstab nur im Programm VGStudioMax angeboten.

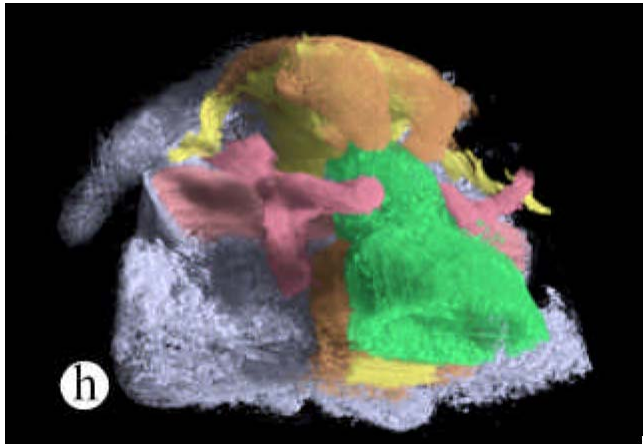


Abb. 30: Volumengrafiken mittels 3D-Zauberstab erstellt (aus Fanenbruck, 2003).

Isosurface:

Neben Volumengrafiken und Oberflächenvisualisierung mittels Image Segmentation gibt es noch eine dritte brauchbare Möglichkeit der Visualisierung: die Isosurface-Funktion. Mit Amira und Imaris (Wirkner & Richter 2004) besteht die Möglichkeit an einer definierten Graustufengrenze eine Oberfläche zu legen. Diese Visualisierung erfordert nur geringen Zeitaufwand und liefert vor allem bei MCT-Daten rasch Außenhüllen der Objekte (siehe Abb. 26). Dadurch könnte diese Methode ein rasch durchzuführender Ersatz für SEM-Aufnahmen sein. Für Innere Organe ist dieses Verfahren nur anwendbar, wenn die Kontraste ausreichend groß sind (siehe Abb. 27). Semidünnschnittdaten sind dafür nur geeignet, wenn vorher in einem Fotobearbeitungsprogramm Artefakte beseitigt werden und der Kontrast erhöht wird (siehe Abb. 31: rechts).

Die gängigen Visualisierungsprogramme arbeiten anhand von Graustufenunterschieden, jedoch könnte in Zukunft auch die Farbinformation mehr an Bedeutung gewinnen. So erstellt die auf der Technischen Universität Wien von Stefan Bruckner entwickelte Software VolumeShop Volumengrafiken, die auf Daten mit Farbinformationen basieren (Bruckner & Gröller 2005).

In Abb. 31 ist der gleiche Datensatz links mit VolumeShop und rechts mit Amira visualisiert dargestellt.

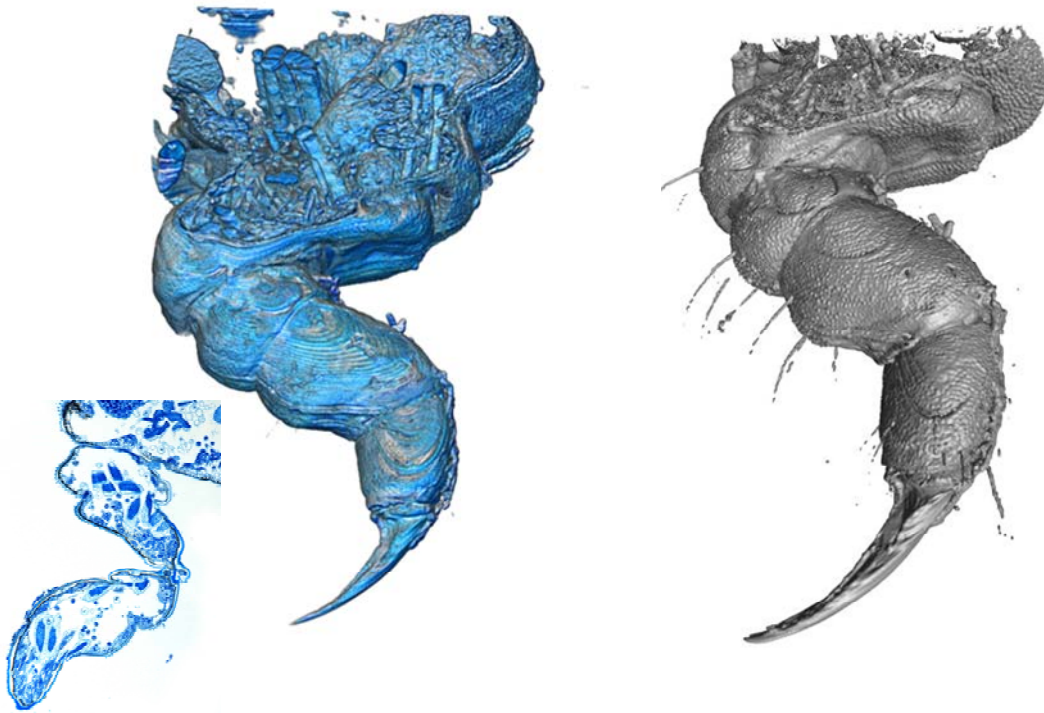


Abb. 31: Mesothorakales Bein von *Podura aquatica* (Collembola). Links unten: Original-Semidünnschnitt, blau gefärbt; links: die Farbinformation der Schnittserien gehen mit VolumeShop nicht verloren; rechts: Isosurface anhand von Grauwertunterschieden, erstellt mit Amira.

Probleme mit Amira:

Programmabstürze sind eine häufige und ärgerliche Begleiterscheinung bei Amira. Ursache dafür dürfte unter anderem sein, dass kein virtueller Arbeitsspeicher verwendet wird und so der Arbeitsspeicher der limitierende Faktor an einem herkömmlichen PC ist. Mit fortschreitender Entwicklung von Hard- und Software (Amira) wird dieses Problem hoffentlich gelöst werden, und dann könnten weitaus höher aufgelöste Semidünnschnittbilder verwendet werden.

Um Programmabstürze zu vermeiden, ist also eine Verkleinerung der digitalisierten Semidünnschnitte und somit eine Verringerung der Auflösung unumgänglich. Die Serien gleich in einer geringeren Auflösung zu fotografieren ist nicht vorteilhaft, da es sich als sehr praktisch erwiesen hat, nachträglich bei unklaren Strukturen auf höher aufgelöste Bilder zurückgreifen zu können. Das erfolgt schnell über den PC, und die Schnitte müssen nur in Ausnahmefällen noch einmal über das Mikroskop betrachtet werden.

4.2 Vergleich 2D zu 3D

In einem zweidimensionalen Bild ist es schwierig alle räumlichen Beziehungen festzuhalten. Je komplexer diese sind, umso schwieriger wird ihre Darstellung. Oft wird die Zeichnung durch Vereinfachung übersichtlicher gemacht und entspricht daher nicht den tatsächlichen Beobachtungen (siehe Abb. 32).

Mit 3D-Daten können nach der Rekonstruktion sehr schnell Screenshots aus unterschiedlichsten Blickwinkeln (siehe Abb. 34) und unterschiedlichen Einstellungen erstellt werden. So können z.B. zur Übersicht alle Organe angezeigt werden und durch Ausblendung oder Transparenz anschließend nur die relevanten Organe dargestellt werden (siehe Abb. 33). Zum besseren Verständnis kann es hilfreich sein, Screenshots auch von mehreren Blickrichtungen zu erzeugen.

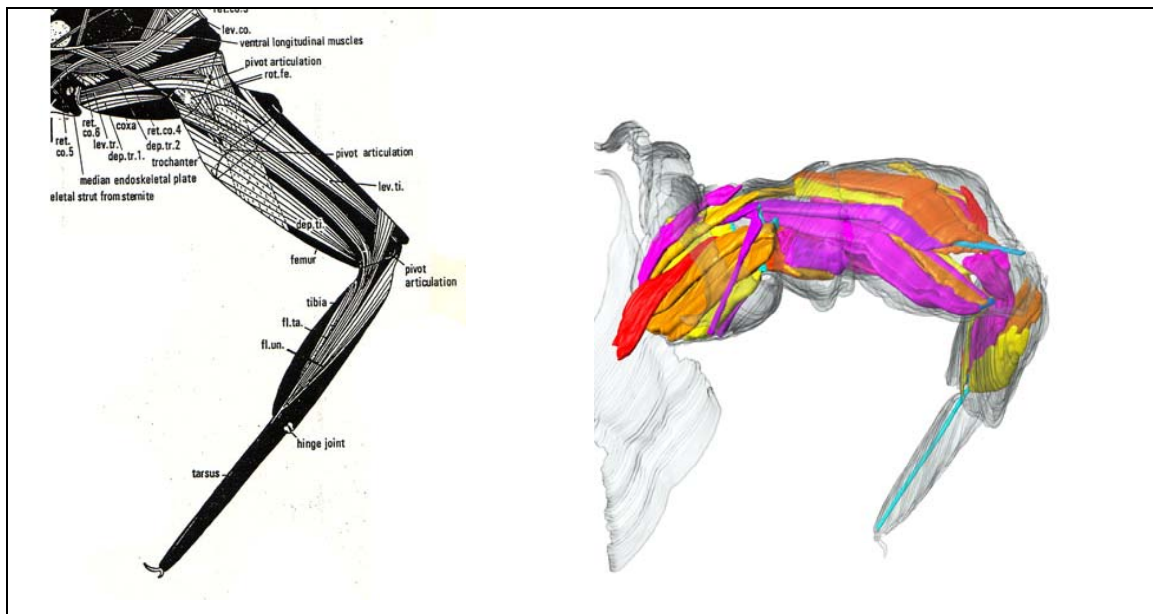


Abb. 32: Muskulatur des mesothorakalen Beines von Campodea. Links: aus Manton 1972; rechts: Bei der 3D-Visualisierung ist ein wesentlich komplexeres System zu sehen, das kaum übersichtlich in einer Abbildung dargestellt werden kann.

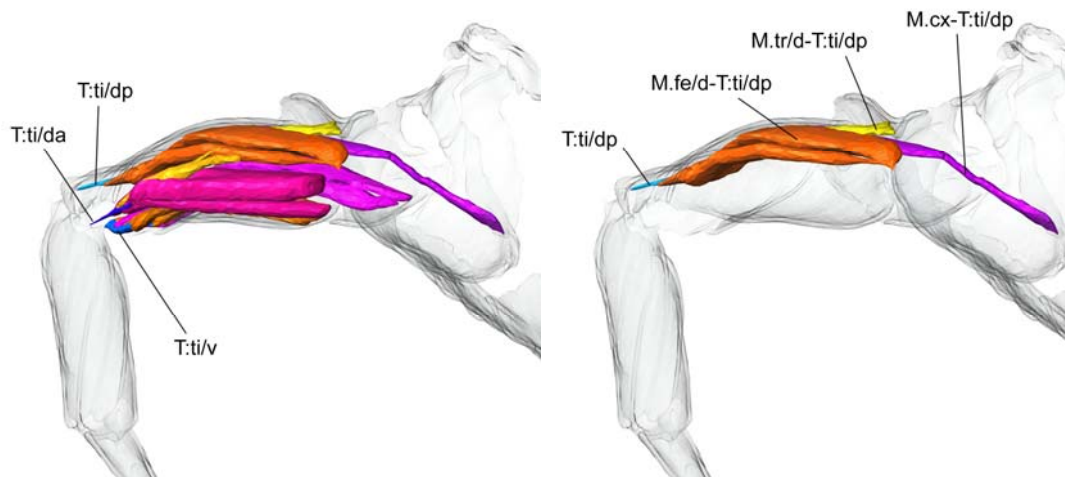


Abb. 33: Um übersichtlichere Abbildungen zu erstellen können für den Betrachter rasch einzelne Strukturen ausgeblendet werden. Auch können Strukturen, wie hier die Podomeren, transparent dargestellt werden.



Abb. 34: Für ein besseres räumliches Verständnis können Abbildungen aus verschiedenen Blickrichtungen erstellt werden.

Der entscheidende Vorteil von 3D-Objekten ist wohl die digitale Darstellung. Auf Websites oder Datenträgern können so Filme oder mit geeigneter Software sogar die dreidimensionalen Objekte selbst betrachtet werden. Im ersten Fall werden die Objekte nach dem „Drehbuch des Autors“ gezoomt, gedreht ein- oder ausgeblendet (siehe Film-Datei auf der beigelegten CD), im zweiten Fall werden aus den Geometriedaten die Bilder in Echtzeit generiert. Somit können Objekte vom Betrachter interaktiv gedreht, gezoomt und auch einzelne Objekte ein- oder ausgeblendet bzw. halbtransparent dargestellt werden (siehe VRML-Dateien auf der beigelegten CD).

Dies geschieht beispielsweise mittels VRML-Dateien (siehe VRML-Dateien in der beigelegten CD). VRML (Virtual Reality Modeling Language) wurde ursprünglich als 3D-Standard für das Internet entwickelt, und heute gibt es zahlreiche und teilweise auch kostenlose Viewer-Software im Angebot.

Eine weitere Möglichkeit ist Acrobat 3D. Durch die jetzt schon weite Verbreitung von Acrobat- (PDF-) Dokumenten ist dies möglicherweise die zukunftsweisende Form der Veröffentlichung von dreidimensionalen Daten.

4.3 Weitere Darstellungsmöglichkeiten mit Amira

Um bestimmte anatomische Bereiche klar darzustellen, kann es, wie bereits erwähnt, von Vorteil sein, unwesentliche Elemente auszublenden bzw. transparent darzustellen. Die transparente Darstellung hat den Vorteil, dass die räumliche Beziehung weiterhin ersichtlich bleibt. Um verschiedene Arten besser miteinander vergleichen zu können, ist es günstig, während der Image Segmentation homologen Elementen bei unterschiedlichen Arten die gleiche Farbe zuzuweisen. Abbildung 35 zeigt, wie beispielsweise die relevanten Muskeln zweier Arten dargestellt und verglichen werden können.

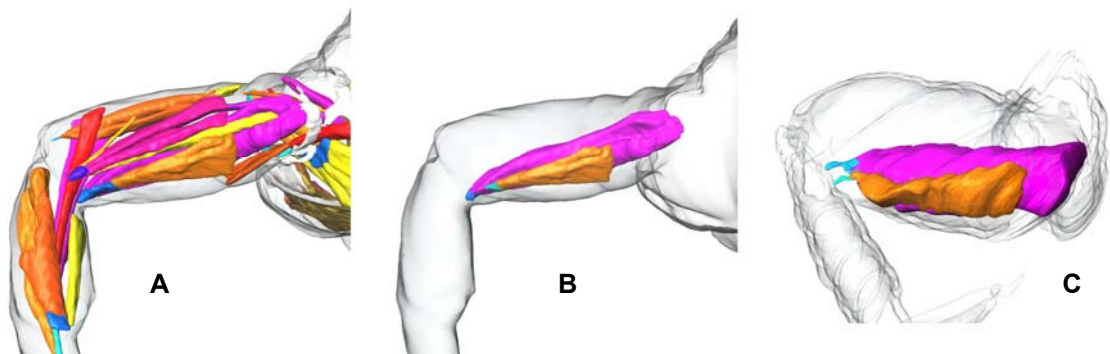


Abb. 35: Homologe Muskeln in gleicher Farbe dargestellt. A: *Octostigma*: alle Beinmuskeln. B: *Octostigma*: ventraler Muskelkomplex im Femur; C: *Catajapyx*: zu B homologer ventraler Muskelkomplex

Teilweise ist dem Betrachter eines Screenshots nicht ersichtlich, wo genau ein bestimmter Muskel an der Kutikula ansetzt. Wenn diese Ansatzstellen separat Segmentiert werden, können diese genau angezeigt werden (siehe Abb. 36).

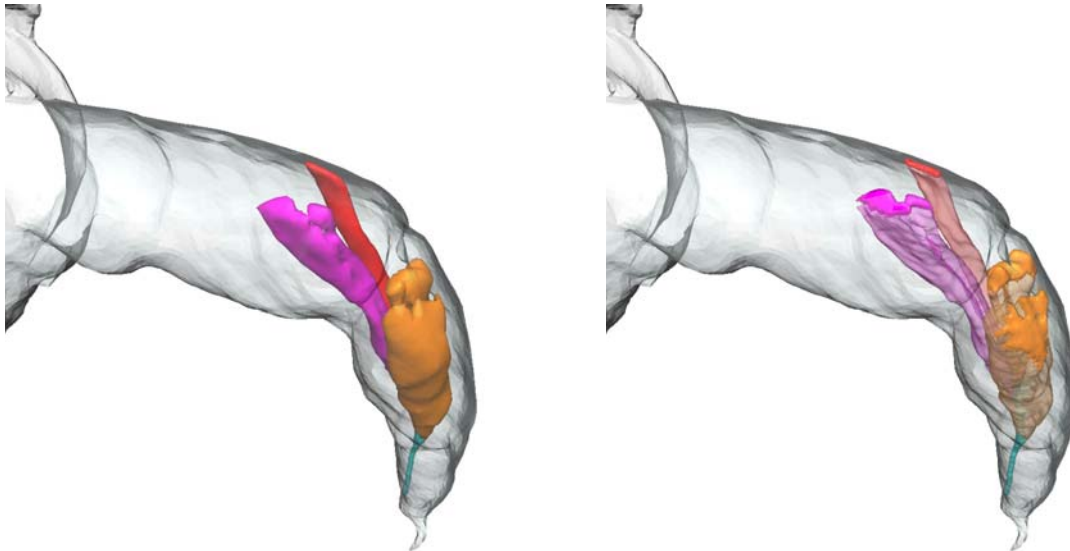


Abb. 36: Darstellungsmöglichkeit der Muskelansätze. Links: ohne Hervorhebung; rechts: Die Ansätze separat segmentiert und nicht transparent dargestellt, die Muskeln transparent eingeblendet.

Außerdem besteht damit auch die Möglichkeit, Literaturabbildungen, bei denen die Ansatzstellen eingezeichnet sind, mit den 3D-Ergebnissen zu vergleichen (siehe Abb. 37).

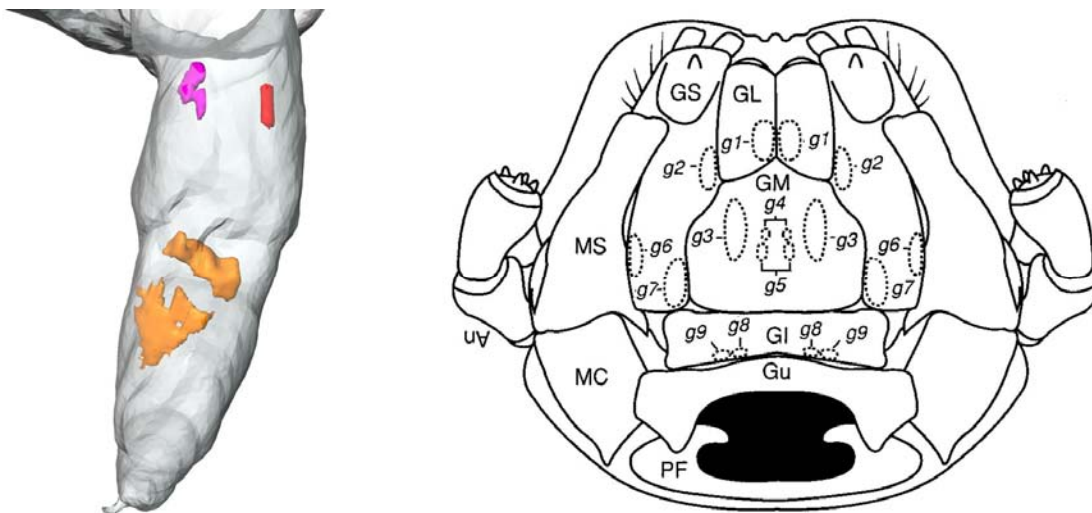


Abb. 37: Vergleichsmöglichkeit mit alten Abbildungen. Links: Nur die Muskelansätze eingeblendet; rechts: Beispielhaft eine Abbildung des Kopfes von *Phyllogonostreptus nigrolabiatus* mit punktiert eingezeichneten Muskelansätzen an der dorsalen Kopfkapsel (aus Wilson, 2002).

4.4 Vor- und Nachteile von MCT und Semidünnschnitten

Eine gängige MCT-Aufnahme am Synchrotron dauert nur ca. 20 Minuten (Betz et al., 2007), und die Daten liegen natürlich sofort digital und dreidimensional vor. Aufnahmen mit Stand- und Desktopgeräten dauern zwar 10- bis 100mal länger (Betz et al., 2007), das Ergebnis liegt trotzdem meist „über Nacht“ vor. Hingegen ist die Erstellung von Semidünnschnitten und die anschließende Digitalisierung sehr zeitaufwendig. Eine gewisse zeitliche Verbesserung bietet das Bändern der Schnitte. Dabei werden die einzelnen Schnitte im Mikroskop erheblich rascher gefunden und somit auch rascher digital fotografiert (Hable et al., 2004).

Ein weiterer Nachteil der Semidünnschnitte ist, dass Artefakte wie Luftbläschen, Schneidescharten etc. vorliegen können oder sogar einzelne Schnitte fehlen. Falls dabei nicht gerade eine entscheidende Stelle verloren gegangen ist, kann dies im Rahmen der Image Segmentation gut durch Interpolation (zumindest unter Amira) kompensiert werden.

Um die richtige räumliche Zuordnung der Semidünnschnitte untereinander zu erhalten, müssen sie nach dem Digitalisieren noch aliniert werden. Mit dem Alignment-Editor funktioniert das in Amira zwar sehr rasch und relativ gut, allerdings wird hier nur darauf geachtet, dass jeder Schnitt mit dem darunter liegenden möglichst gut übereinstimmt, das spiegelt aber möglicherweise nicht hundertprozentig die tatsächliche räumliche Zuordnung wider (siehe Abb. 38).

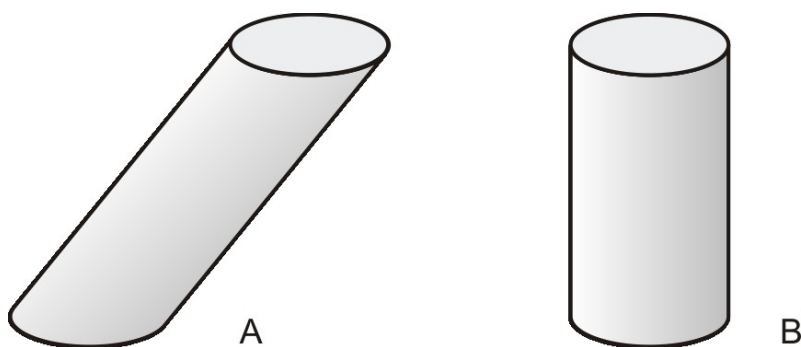


Abb. 38: Vereinfachtes Problem beim Alinieren: horizontale Schnitte eines schiefen Zylinders (A) werden, wenn keine Referenzstrukturen vorhanden sind, als gerader Zylinder (B) aliniert.

Durch eine neue Methode, bei der während des Schneidevorganges die in Wachs oder Harz eingebettete Probe nach jedem Schnitt von oben digital fotografiert wird (Gerneke

et al., 2007), konnte das Alinierungsproblem gelöst wrden.

Neben den oben erwähnten Nachteilen besitzen Semidünnschnitte auch erhebliche Vorteile. So sind Auflösung und Kontrast erheblich höher, und Farbinformationen können durch geeignete Färbemethoden hinzugefügt werden. Für die Rekonstruktion muss zumindest derzeit die Datenmenge und somit die Auflösung verringert werden (siehe Kapitel 4.1), doch ist sie vor allem bei sehr kleinen Strukturen erheblich besser als bei MCT-Aufnahmen. Außerdem kann jederzeit noch auf die höher aufgelösten Originalfotos bzw. auf die Originalschnitte zugegriffen werden. Des Weiteren ist diese Methode auch weitaus kostengünstiger.

Der Kontrast bei den MCT-Aufnahmen kann durch Kontrastmittel erheblich verbessert werden. So können etwa durch Osmiumfixierung lipidhaltige Organe hervorgehoben werden (siehe Abb. 27). Die Anwendung der Phasenkontrast-Methode ist eine weitere Möglichkeit, um kontrastreichere Aufnahmen zu erzielen (Hönnicke et al., 2005). Wie in Abb. 39 ersichtlich, kann damit ein erheblich besseres Bild erzeugt werden als mit einer herkömmlichen MCT-Aufnahme.

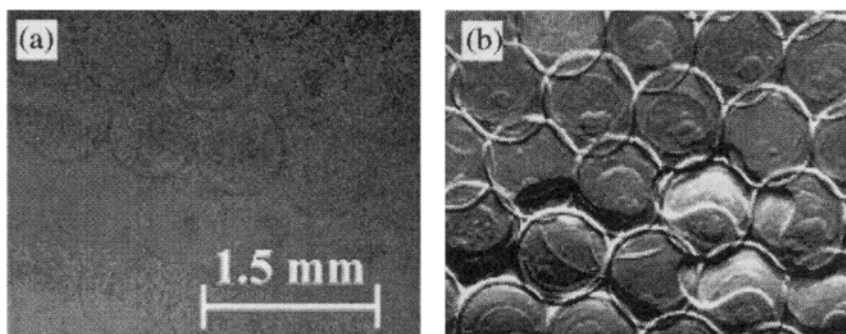


Abb. 39: Stinkwanzen-Eier: Aufnahmen mit konventioneller Methode (a) und Phasenkontrastmethode (b). (aus Hönnicke et al., 2005)

4.5 Die Methoden Confocal-Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) und Magnetresonanztomographie (MRT)

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die 3D-Rekonstruktion von Semidünnschnitten und MCT-Daten. Die meisten Folgerungen können jedoch problemlos auch auf Datensätze angewendet werden die durch CLSM oder MRT erzeugt wurden.

Jedoch ist die Datengewinnung aus diesen Methoden bei kleinen Arthropoden nur bedingt erfolgreich:

- (i) Mit einer maximalen Auflösung von $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 75\mu\text{m}$ (siehe Kapitel 1 Einleitung) ist der Einsatz der MRT, wegen der Kleinheit der Organe oft nicht zielführend.
- (ii) Mittels CLSM kann zwar eine sehr hohe Auflösung erzielt werden, doch fehlt den meisten Tieren eine transparente Kutikula, die für diese Methode unbedingt notwendig ist. Für kleine, durchsichtige (meist aquatisch lebende) Arthropoden ist diese Methode jedoch gut geeignet.

4.6 Skelettmuskelsystem des Beines bei Dipluren

Thorax-Coxa-Gelenk

Bei allen 3 Arten konnte nur eine ventrale Artikulation beobachtet werden. Das bestätigt die Aussagen von Boudreaux (1987), der ein einzelnes ventrales Drehgelenk als typisch für Myriapoden und Dipluren beschreibt.

Manton (1972) hingegen beschreibt eine ventrale und eine dorsale Artikulation, wenngleich die dorsale nicht so stark sklerotisiert ausgebildet ist.

Vermutlich ersetzen weichhäutige Strukturen die Gelenksfunktion, und das Bein kann, so wie von Manton beschrieben, nach vor und zurück geschwungen werden.

Coxa-Trochanter-Gelenk

Wie ebenfalls von Manton (1972) beschrieben, ist dieses Gelenk dicondyl mit einer anterioren und einer posterioren Artikulation. Das Muskelsystem erscheint etwas komplexer als von Manton beschrieben. Der Depressormuskel (depr.tr.2) von Manton kann in zwei Muskeln, mit nebeneinander liegenden, aber an unterschiedlichen Sehnen liegenden Insertionsstellen, aufgegliedert werden (**M.cx/v-T:tr/vv** und **M.cx/v-T:tr/v**). Der von Manton beschriebene Levatormuskel (lev.tr) entspricht vermutlich den Muskeln **M.cx/va-tr/dp** und **M.cx/va-tr/da**, wobei **M.cx/va-tr/dp** eventuell mit einem Muskel gleichzusetzen ist, der in Mantons Abbildung nicht beschriftet ist und auch nicht beschrieben wird (in Abb. 40 mit einem „?“ beschriftet).

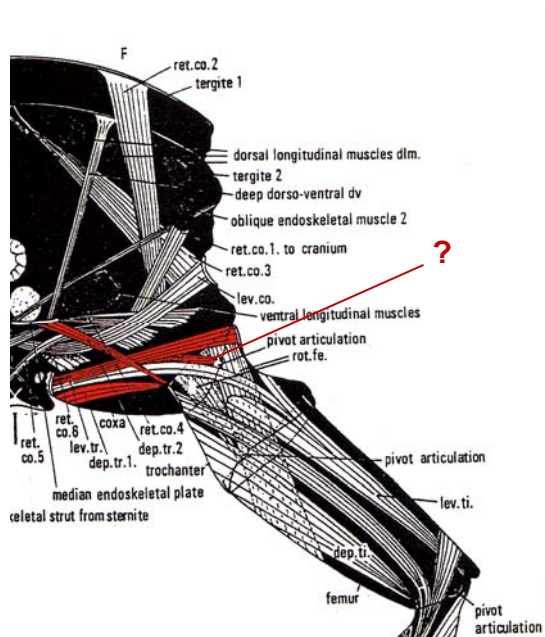


Abb. 40: Coxa-Trochanter-Gelenk wie von Manton (1972) beschreiben. Die im Text erörterten Muskeln sind rot dargestellt. Die Zuordnung eines Muskels (?) ist unklar, entweder ein Teil von Muskel **lev.tr** oder ein eigener nicht beschriebener Muskel. (verändert nach Manton, 1972)

Ein einziger Muskel (**M.end-T:tr/va**) entspringt dem Endoskelett, allerdings nur bei *Campodea*. Auch von Manton wird dieser Muskel für *Campodea* beschrieben, es ist jedoch nicht genau nachvollziehbar, ob dieser laut Manton auch bei *Japyx* vorhanden ist oder nicht. Statt **M.end-T:tr/va** finden wir bei *Catajapyx* und *Octostigma* den Muskel **M.cx/p-T:tr/v**, der nicht am Endoskelett, sondern an der proximalen Coxa entspringt.

Zusätzlich gibt es bei *Campodea* und *Octostigma* noch einen weiteren, von Manton nicht beschriebenen Trochantermuskel (**M.cx/vp-tr/d** bzw. **M.cx/va-tr/d**).

Trochanter-Femur-Gelenk

Manton beschreibt das Trochanter-Femur-Gelenk der Dipluren als monocondyl, mit einer auffälligen anterioren Artikulation und einer fehlenden posterioren Artikulation (siehe Abb. 41). Entgegen dieser Darstellung konnte aber auch eine etwas schwächere ventral bis posterior gelegene Artikulation beschrieben werden (siehe Abb. 42).

Im Gegensatz zu dem einzelnen von Manton beschriebenen Rotator-Muskel konnten bei allen drei Dipluren-Arten vier Muskelkomplexe gefunden werden. Keiner von diesen ist eindeutig mit Mantons Rotator-Muskel zu homologisieren (siehe Abb. 41 und Abb. 42).

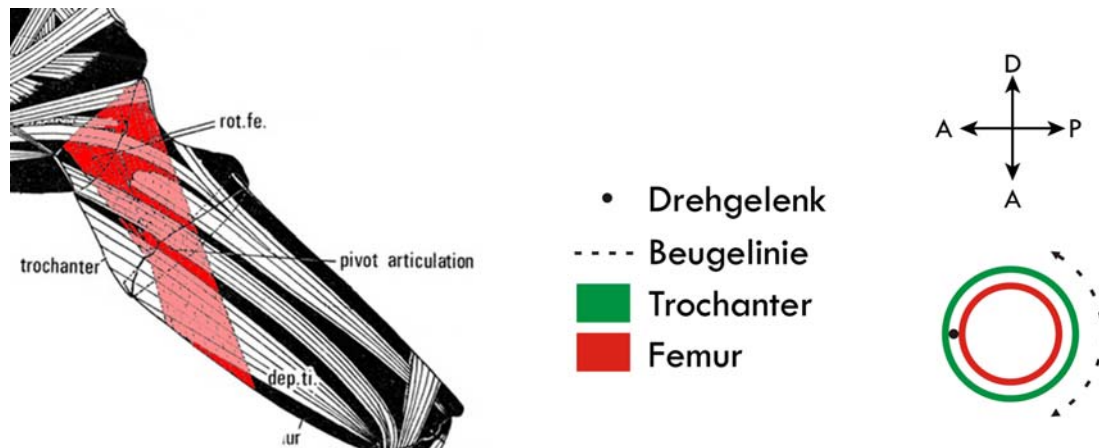


Abb. 41: Trochanter-Femur-Gelenk von *Campodea* wie von Manton (1972) beschrieben. Ein Schwingen bzw. Drehen wird durch einen einzelnen Femur-Muskel über ein monocondyles Gelenk ermöglicht. (verändert nach Manton, 1972)

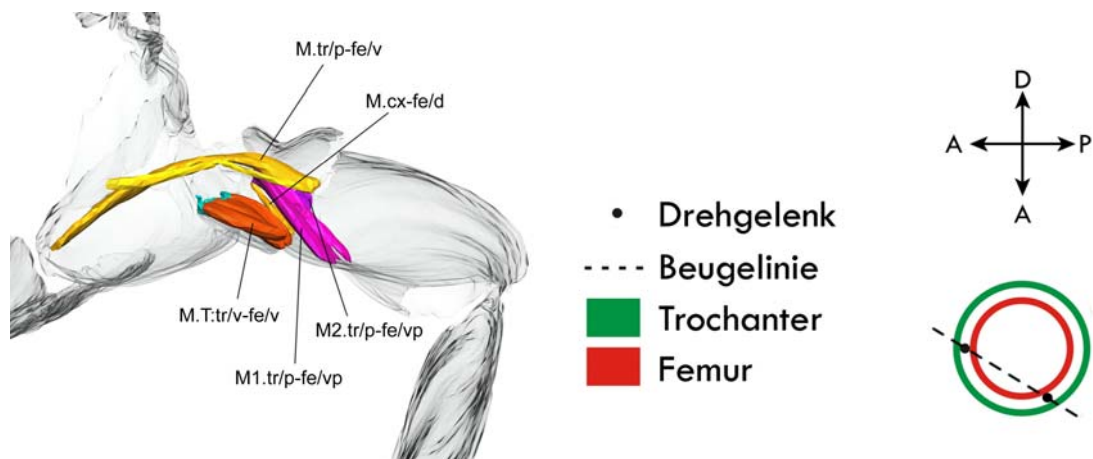


Abb. 42: Trochanter-Femur-Gelenk von *Campodea* mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (rechtes Bein zur besseren Vergleichbarkeit gespiegelt): Vier Muskelsysteme ermöglichen das Beugen über ein dicondyles Gelenk.

Zur Unterstützung der Monophylie der Dilura kann also das monocondyle Schwing- und Drehgelenk nicht mehr, wie von einigen Autoren verwendet (Wheeler et al., 2001, Giribet et al., 2004 und 2005), als mögliche Synapomorphie der Campodeina und Japygina verwendet werden.

Femur-Tibia-Gelenk

Die Ergebnisse der Gelenksstrukturen decken sich mit Mantons Beschreibungen. Die Tibia formt einen dorsalen Processus (Z). Ein femoraler Processus (W) liegt anterior davon und ist mit einer anterioren Schulter der Tibia (Y) verbunden (siehe Abb. 43). Allerdings spiegelt die simple Interpretation als monocondyles Drehgelenk die

Komplexheit dieses Gelenkes nicht wider. Der eigentliche Drehpunkt liegt dorsal etwas anterior und wird durch die Schulter Y und den femoralen Processus W gebildet. Funktional ist dieses Gelenk wohl eher ein Scharniergelenk als ein Drehgelenk.

Dieses Gelenk ist auch nicht wie von Wheeler (2001) und Giribet (2004) mit dem einfachen Scharniergelenk der Collembola und Protura zu homologisieren. Hingegen zeigen erste Ergebnisse bei Untersuchungen bei *Lepisma* (Szucsich & Pass, 2008) ein ähnlich komplexes Kniegelenk wie bei den Dipluren und sind so möglicherweise mit diesen homologisierbar. Das widerspricht der bisherigen Beschreibung eines dicondylen Gelenks bei den Zygentoma (Manton, 1972).

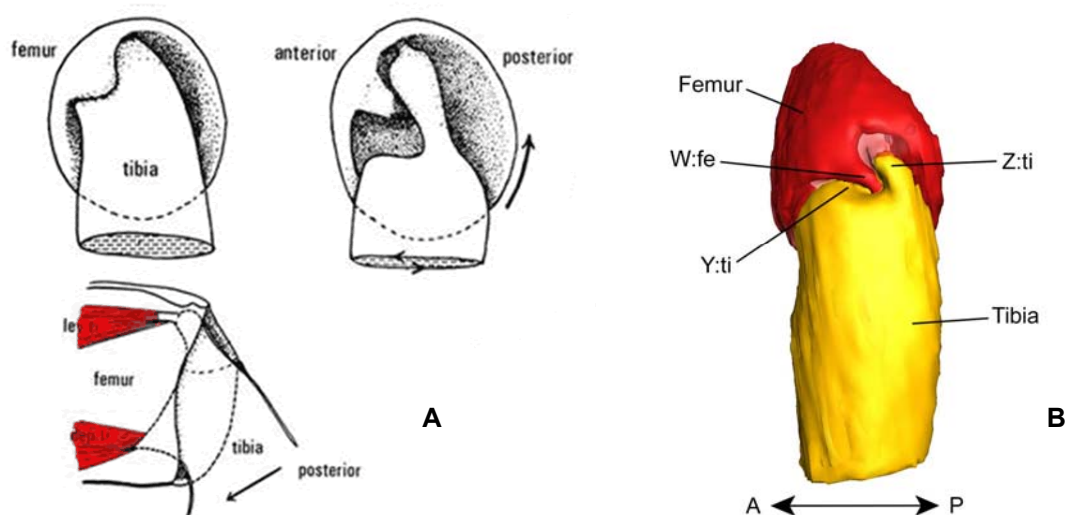


Abb. 43: Kutikuläre Strukturen des Femur-Tibia-Gelenks. A: *Heterojapyx* (verändert nach Manton (1972); B: *Octostigma* (rechtes Bein zur besseren Vergleichbarkeit gespiegelt), 3D-Rekonstruktion, die weichhäutige Gelenkmembran ist transparent dargestellt.

Neben den von Manton beschriebenen dorsalen und ventralen Muskeln (siehe Abb. 43 und Abb. 44) konnte noch ein dritter Muskelkomplex rekonstruiert werden. Diese drei Komplexe setzen an drei (*Campodea*) bzw. vier (*Catajapyx* und *Octostigma*) unterschiedlichen Sehnen an (siehe Abb. 45 bzw. Ergebnisteil).

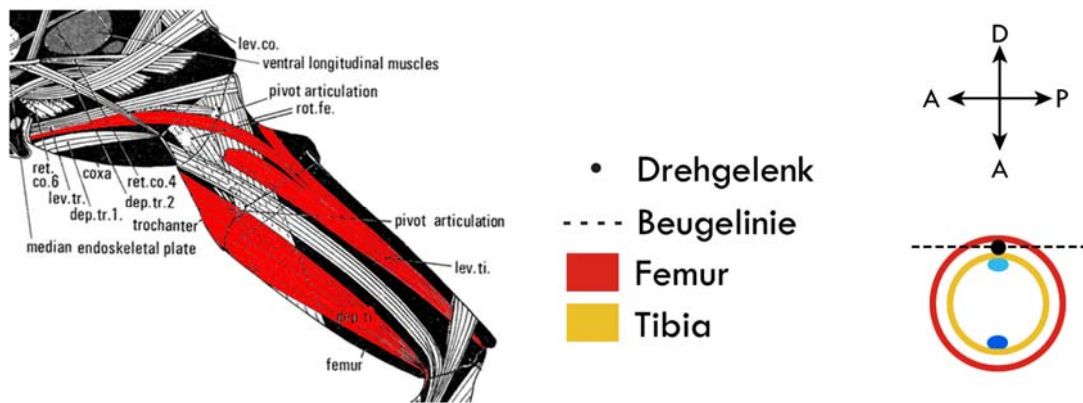


Abb. 44: Femur-Tibia-Gelenk von *Campodea* wie von Manton (1972) beschrieben. Über ein dorsales monocondyles Drehgelenk und einen ventralen bzw. einen dorsalen Muskel wird die Tibia eingeklappt bzw. ausgestreckt. (verändert nach Manton, 1972)

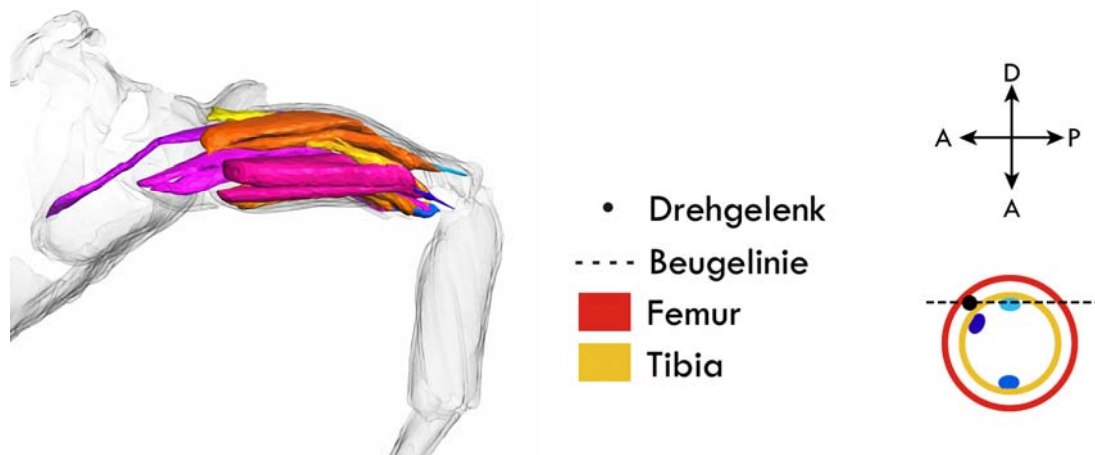


Abb. 45: Femur-Tibia-Gelenk von *Campodea* mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (rechtes Bein zur besseren Vergleichbarkeit gespiegelt): Drei Muskelsysteme ermöglichen das Beugen über ein komplexes Gelenk.

Tibia-Tarsus-Gelenk

Auch bei diesem Gelenk können Mantons Ergebnisse nicht ganz bestätigt werden. Das Gelenk ist kein einfaches Scharniergelenk, sondern im Fall von *Octostigma* ein Gelenk mit einer tarsalen Rinne und einem tibialen, gestreckten Kopf, der genau in diese Rinne passt (siehe Abb. 46 und Abb. 47). Bei *Campodea* scheint sogar ein monocondyles Gelenk ausgebildet zu sein (siehe Ergebnisse). Der ventrale Bereich des Tarsus wird beim Beugen, wie von Manton beschrieben in die Tibia eingestülpt. Zur vollständigen Klärung der Morphologie dieses Gelenkes könnten SEM-Aufnahmen bzw. weitere Detailrekonstruktionen einen wichtigen Beitrag liefern.

Zu dem einzigen von Manton beschriebenen Muskel (siehe Abb. 46) konnte bei allen

drei untersuchten Arten noch ein zweiter Muskel mit anderem Ursprung gefunden werden. *Catajapyx* weist zusätzlich noch einen dritten Muskel auf.

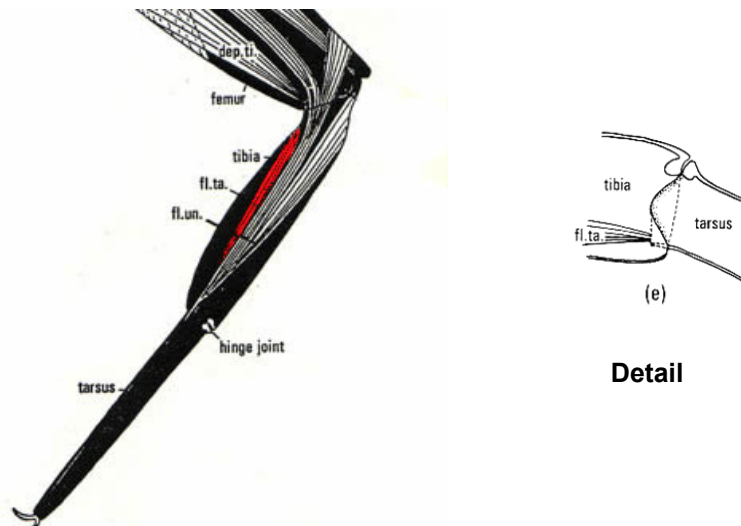


Abb. 46: Tibia-Tarsus-Gelenk von *Campodea* wie von Manton (1972) beschrieben. Ein einzelner Muskel bewegt mittels einem dorsal gelegenen Scharniergelenk den Tarsus. (verändert nach Manton, 1972)

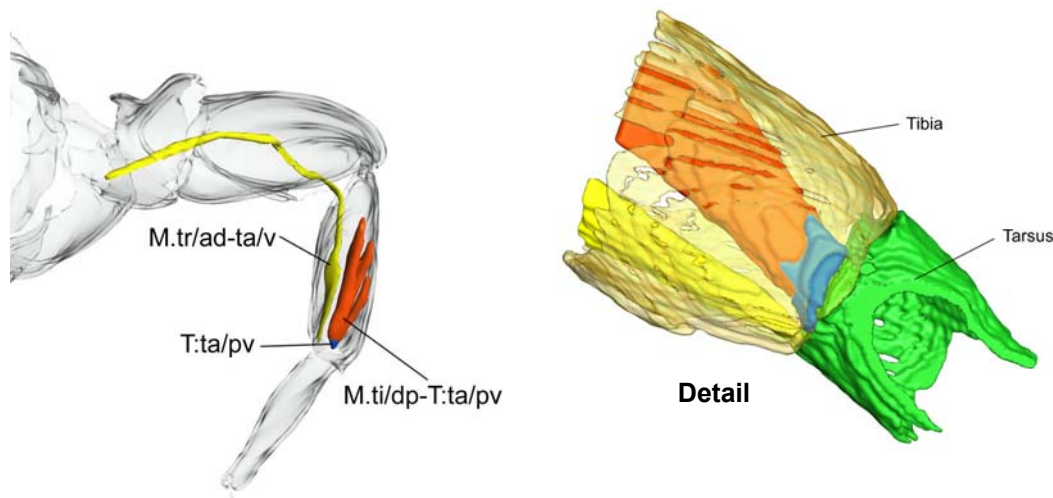


Abb. 47: Tibia-Tarsus-Gelenk von *Campodea* (links) und *Octostigma* (rechts) mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (rechtes Bein zur besseren Vergleichbarkeit gespiegelt): Zwei Muskelsysteme ermöglichen das Beugen über ein komplexes Gelenk.

Tarsus-Praetarsus-Gelenk

Eine lange Sehne setzt, wie auch von Manton beschrieben, an der ventralen Basis des Praetarsus an. Auch Muskeln, die ihren Ursprung am Femur und Tarsus besitzen, können bestätigt werden. Ein Muskel, der dem Trochanter entspringt (siehe Abb. 48) und an dieser Sehne inseriert, konnte jedoch nicht gefunden werden. Möglicherweise

hat hier Manton dem Muskel (**M.tr/ad-ta/v**) des Tibia-Tarsus-Gelenks (siehe Abb. 47) die falsche Insertionsstelle zugewiesen.

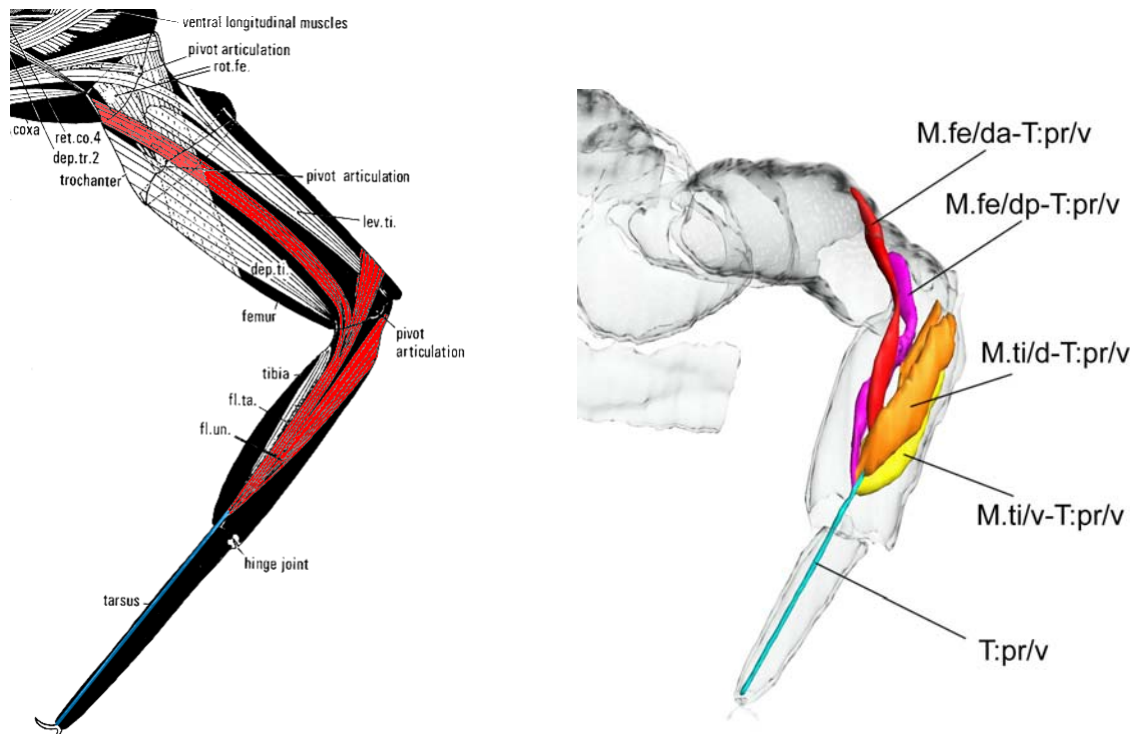


Abb. 48: Tarsus-Praetarsus-Gelenk von *Campodea*. Links: verändert nach Manton, 1972; rechts: Ergebnis der vorliegenden Arbeit (rechtes Bein zur besseren Vergleichbarkeit gespiegelt)

Da bei *Catajapyx* und *Octostigma* nicht die gleichen Muskelsysteme fehlen, könnten die vier Muskelsysteme von *Campodea* die ursprüngliche Ausgangsform darstellen. *Catajapyx* und *Octostigma* hätten demnach jeweils ein anderes Muskelsystem reduziert.

5 Literatur

- Attwood D (2006). Nanotomography comes of age - The use of X-rays to construct three-dimensional tomographic images well established in medicine. The same principle is being extended to nanoscale, bringing us startlingly accurate pictures of tiny objects. *Nature*, Vol 442:642-643.
- Baum E, Hertel W and Beutel RG (2007). Head capsule, chephalic central nervous system and head circulatory system of an aberrant orthopteran, *Prosarthria teretirostris* (Caelifera, Hexapoda). *Zoology* 110:147–160.
- Betz O, Wegst U, Weide D, Heethoff M, Helfen L, Lee W-K and Cloetens P (2007). Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. *Journal of Microscopy*, Vol. 227, Pt 1 2007, pp. 51–71.
- Bitsch C and Bitsch J (2000). The phylogenetic interrelationships of the higher taxa of apterygote hexapods. *Zoologica Scripta* 29:131-156.
- Blumer MJF, Gahleitner P, Narzt T, Handl C and Ruthensteiner B (2002). Ribbons of semithin sections: an advanced method with a new type of diamond knife. *Journal of Neuroscience Methods*, 120:11–16.
- Böck P (ed.) (1989). *Mikroskopische Technik / Romeis*, 17. Auflage. München: Urban und Schwarzenberg
- Boudreaux HB (1987). *Arthropod phylogeny with special reference to insects*, reprint. Malabar: Robert E. Krieger Publishing Company
- Bruckner S and Gröller (2005). Technical Report. VolumeShop: An Interactive System for Direct Volume. TR-186-2-05-04, www.cg.tuwien.ac.at/research/publications/2005/TR-186-2-05-04/
- Fanenbruck M (2003). *Die Anatomie des Kopfes und des cephalen Skelett-Muskelsystems der Crustacea, Myriapoda und Hexapoda: ein Beitrag zum phylogenetischen System der Mandibulata und zur Kenntnis der Herkunft der Remipedia und Tracheata*: Ruhr-Universität Bochum, 450 pp.
- Fanenbruck M and Harzsch S (2005) A brain atlas of *Godzillignomus frondosus* Yager, 1989 (Remipedia, Godzilliidae) and comparison with the brain of

- Speleonectes tulumensis* Yager, 1987 (Remipedia, Speleonectidae): implications for arthropod relationships *Arthropod Structure & Development* 34:343-378.
- Gassner G, Lohman AB (1987). Combined proton NMR imaging and spectral analysis of locust embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(15):5297–5300.
- Gerneke DA, Sands GB, Ganesalingam R, Joshi P, Caldwell BJ, Smaill BH and Legrice IJ (2007). Surface Imaging Microscopy Using an Ultramiller for Large Volume 3D Reconstruction of Wax- and Resin-Embedded Tissues. *Microscopy Research and Technique* 70:886–894.
- Giribet G, Richter S, Edgecombe GD and Wheeler WC (2005). The position of crustaceans within Arthropoda - Evidence from nine molecular loci and morphology. In *Crustacea and Arthropod Relationships.*, S. Koenemann and R.A. Jenner, eds, pp.307-352.
- Hable MF, Szucsich NU, Pennerstorfer M, Walzl M and Pass G (2006). 3D-reconstruction in arthropods: advantages and disadvantages of semi-thin section series and tomography. 99. Annual Meeting of the German Zoological Society, Münster, Germany. :13.
- Haddad D, Schaupp F, Brandt R, Manz G, Menzel R and Haase A (2004). NMR Imaging of the honeybee brain. 7pp. *Journal of Insect Science*, 4:7
- Hart AG, Bowtell RW, Köckenberger W, Wenseleers T and Ratnieks FLW (2003). Magnetic resonance imaging in entomology: a critical review. 9pp. *Journal of Insect Science*, 3:5.
- Hönnicke MG, Foerster LA, Navarro-Silva MA, Menk R-H, Rigon L and Custalis C (2005). Preliminary studies of enhanced contrast radiography in anatomy and embryology of insects with Elettra synchrotron light. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 548:207-212.
- Hörnschemeyer T, Beutel RG and Pasop F (2002). Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography. *J Morphol* 252:298–314.
- Klaus AV, Kulasekera VL and Schawaroch V (2003). Three-dimensional visualization of insect morphology using confocal laser scanning microscopy: *Journal of Microscopy*, Volume 212, Number 2, November 2003:107-121(15).

- Manton SM (1972). The evolution of arthropodan locomotory mechanisms: Part 10. Locomotory habits, morphology and evolution of the hexapod classes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 51:203-400.
- Manton SM (1977). *The Arthropoda, Habits, Functional Morphology and Evolution*. (Oxford: Claredon Press).
- Pernstich A, Krenn HW and Pass G (2003). Preparation of serial sections of arthropods using 2,2-dimethoxypropane dehydration and epoxy resin embedding under vacuum. *Biotechnic & Histochemistry*, 78 (1):5–9.
- Richardson KC, Jarett L and Finke EH (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology*, 35:313–323.
- Sinha SK (2004). Application of synchrotron radiation techniques to nanoscience. *Radiation Physics and Chemistry*, 70:633-640.
- Spurr AR (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26:31–43.
- Szucsich NU and Pass G (2008). Incongruent phylogenetic hypotheses and charakter conflicts in morphology: The root and early branches of the hexapodan tree. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 16:415-429.
- Wilson HM (2002). Muscular Anatomy of the Millipede *Phyllogonostreptus nigrolabiatus* (Diplopoda: Spirostreptida) and Its Bearing on the Millipede “Thorax”. *Journal of Morphology* 251:256–275.
- Wirkner CS and Richter S (2004). Improvement of Microanatomical Research by Combining Corrosion Casts With MicroCT and 3D Reconstruction, Exemplified in the Circulatory Organs of the Woodlouse: Microscopy Research and Technique, 64:250–254.

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mir dieses Studium ermöglichten und mich mit viel Geduld unterstützten.

Mein spezieller Dank gilt Prof. Dr. Günther Pass für die Vergabe dieser Diplomarbeit sowie Dr. Nikolaus Szucsich für deren Betreuung. Sie schufen ein kollegiales Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe, das eine konstruktive Zusammenarbeit ermöglichte, und boten mir stets hilfreiche Betreuung. Ihre Geduld und professionelle Anleitung halfen mir diese Arbeit fertig zu stellen.

Bei Prof. Dr. Manfred Walzl bedanke ich mich für die hilfreiche Erläuterung der Vorgänge beim Digitalisieren.

Danke meinem Bruder Franz für das Korrekturlesen und Dr. Marc Sztatecsny für die Hilfe beim englischen Abstract.

Spezieller Dank gebührt auch meiner Frau Cordula für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihren Verzicht auf private Unternehmungen.

Schließlich möchte ich mich bei allen Freunden und Freundinnen bedanken, die mich im Laufe meines Studiums immer wieder ermutigten weiterzumachen und den Glauben an mich nicht aufgaben.

Zusammenfassung

Die Arbeit gibt einen Überblick über die zurzeit möglichen Methoden zur Gewinnung von 3D-Datensätzen und deren Visualisierung bei morphologischen Untersuchungen von kleinen Tieren. Vor- und Nachteile werden erörtert und es wird gezeigt, dass für die Analyse anatomischer Strukturen von kleinen Insekten nur digitalisierte Semidünnschnittserien und mit Einschränkungen Mikrocomputertomografie-Aufnahmen ausreichende Ergebnisse liefern können. Eine Ausnahme bilden durchsichtige Tiere, bei denen auch mit der Confocal-Laserscanning-Mikroskopie geeignete Datensätze erzeugt werden können.

In einem weiteren Abschnitt erfolgt eine eingehende Auseinandersetzung mit dem 3D-Rekonstruktionsprogramm Amira. Neben der Optimierung der Darstellungsmöglichkeiten der 3D-Daten für die genannten Problemstellungen wurde eine spezielle Anleitung für die Arbeit mit Semidünnschnittserien erarbeitet.

Als exemplarisches Beispiel wurde das Skelettmuskelsystem der Dipluren untersucht. Anhand von Semidünnschnittserien wurde das mesothorakale Bein von drei Arten (*Campodea augens*, *Catajapyx aquilonari* und *Octostigma sinensis*) rekonstruiert und die Daten mit denen von Manton (1972, 1977) verglichen. Mantons Beschreibung der Beinmerkmale, die auf Sektionen und funktionellen Schlußfolgerungen basieren, wurden von vielen Autoren als potentielle Synapomorphien der Dipluren gewertet. In der vorliegenden Untersuchung konnten sowohl bei den kutikulären Gelenksstrukturen als auch im Muskelsystem wichtige Unterschiede zu den Arbeiten von Manton festgestellt werden:

- (i) es existiert nur eine ventrale und keine dorsale Artikulation beim Thorax-Coxa-Gelenk.
- (ii) nicht ein monocondyles sondern ein dicondyles Trochanter-Femur-Gelenk ist vorhanden.
- (iii) an Stelle eines femoralen Rotator-Muskel sind vier Muskelsysteme vorhanden von denen keines mit dem Rotator-Muskel homologisiert werden konnte.
- (iv) ein dritter zusätzlicher Muskelkomplex konnte für das Femur-Tibia-Gelenk nachgewiesen werden.

- (v) zusätzlich zu dem einzigen von Manton beschriebenen Muskel des Tibia-Tarsus-Gelenks konnte noch ein weiterer Muskel (bzw. zwei zusätzliche Muskeln bei *Catajapyx*) gefunden werden.
- (vi) ein von Manton beschriebener Muskel der dem Trochanter entspringt und an der Tarsussehne inseriert, existiert nicht.

In Anbetracht dieser Divergenzen zu den Beschreibungen von Manton ist eine phylogenetische Bewertung dieser Merkmalszustände erst nach einer vergleichenden Neuuntersuchung der Beine bei Vertretern von Außengruppen möglich.

Abstract

The first part of the thesis aims to provide an overview on the presently relevant methods for obtaining and visualizing 3D data sets. The comparison of these methods revealed that only semi-thin section series and x-ray microtomography can offer adequate results for the visualisation of anatomical structures in small insects. Only in transparent animals, confocal laser scanning microscopy can be applied as an alternative method. In addition, a profound examination of the 3D reconstruction software Amira is provided including an instruction guide for the 3D visualisation of semi-thin section series.

The second part of the thesis describes as an example the muscular system of a mesothoracic leg of the Dipluran. Using semi-thin section data, the leg of three species (*Campodea augens*, *Catajapyx aquilonari*, and *Octostigma sinensis*) was reconstructed and the results compared to available data of Manton (1972, 1977). Manton's description of leg characters are based on dissections and functional conclusions and were considered as potential synapomorphies of the Diplura. In the present work, several differences to Mantons descriptions were found in the cuticular structures of the joints as well as in the muscular system. The phylogenetic relevance of these differences can be judged only after a thorough re-investigation of the legs in outgroup taxa.

Lebenslauf

Geb.: 30.06.1969 in St. Pölten

Kontakt: hablemax@gmx.at

Ausbildung

1989 – 2008 Universität Wien, Zoologie- und Ökologiestudium

1988 – 1989 Technische Universität Wien, Architekturstudium

1983 – 1988 HTBLA Krems, Hochbau

1979 – 1983 Hauptschule in Prinzersdorf / NÖ

Berufstätigkeit

Seit 2004 EDV-Techniker an der Universität für Bodenkultur, Wien

2001 – 2004 EDV-Unterricht beim BFI-Wien

Seit 1999 Selbständige Tätigkeit, Erstellung von Websites (Design und Programmierung)

1998 – 1999 Zivildienst beim Wiener Integrationsfonds, Wien

1986 – 1998 Technischer Zeichner und Bauaufsicht, Architekturbüro Hable, Prinzersdorf / NÖ

Anhang**Anleitung zur 3D-Rekonstruktion von morphologischen Strukturen
bei kleinen Arthropoden mit Amira 3.1****Inhalt**

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Erklärungen zur Anleitung | 2 |
| 2 | Allgemein | 3 |
| 2.1 | Systemvoraussetzungen | 3 |
| 2.2 | Programmoberfläche | 3 |
| 2.3 | Arbeiten und Speichern im Amira-Hauptfenster | 4 |
| 3 | Arbeiten mit Daten aus Semidünnschnitten | 6 |
| 3.1 | Vorarbeiten und Daten ins Amira laden | 6 |
| 3.2 | Einzelne Schnitte aneinander ausrichten (Alignment) | 7 |
| 3.3 | Information in Graustufen umwandeln | 9 |
| 4 | Volumengrafik (Votex) | 11 |
| 5 | Image Segmentation | 13 |
| 6 | Oberflächen erzeugen | 17 |
| 6.1 | Datenmenge reduzieren und glätten | 17 |
| 6.2 | Oberfläche anzeigen | 18 |
| 7 | Ergebnisse veröffentlichen | 20 |
| 7.1 | Snapshot | 20 |
| 7.2 | VRML-Export | 20 |
| 7.3 | Video erstellen | 21 |
| 8 | Weiterführende Information | 22 |

1 Erklärungen zur Anleitung

Die Anleitung soll für Einsteiger so einfach wie möglich sein, daher beinhaltet sie nur jene Funktionsteile des Programms, die für die Rekonstruktion und Visualisierung von morphologischen Strukturen unbedingt benötigt werden. Die folgende Anleitung legt besonderes Augenmerk auf die Verarbeitung von Semidünnschnitt-Daten, kann aber weitgehend auch für MCT-Daten verwendet werden.

* steht für einen beliebigen Dateinamen (z.B.: *.am für eine Amira-Datei)

Kursiv ... für Ausdrücke aus dem Programm (Befehle, Menübefehle, Editoren, etc.)

2 Allgemein

2.1 *Systemvoraussetzungen*

Das Programm läuft unter verschiedenen Windows- und Unix-Versionen. Entscheidend dabei ist der Arbeitsspeicher. Laut Handbuch läuft das Programm ab 64 MB Arbeitsspeicher. Ein vernünftiges Arbeiten ist aber erst ab 1 GB möglich. Empfehlenswert sind allerdings mindestens 2 GB. Trotzdem kommt es, zumindest bei der Windowsversion, in der Praxis oft zu Programmabstürzen und man muss ständig darauf achten die Datenmenge zu reduzieren und häufig Zwischenzuspeichern. Die Reduktion der Daten beginnt schon vor dem Einspielen der Schnittserien-Fotos.

2.2 *Programmoberfläche*

Amira besteht aus 3 Fenstern: Das **Amira-Hauptfenster**, in dem hauptsächlich gearbeitet wird, der **Viewer** zum Betrachten der Objekte und die **Konsole**, in der die Befehle abgearbeitet werden und etwaige Fehler aufgelistet werden (siehe Abb. 1).

Das Amira-Hauptfenster beinhaltet die grünen Datenobjekte, an denen unterschiedliche Rechenoperationen durchgeführt werden können. Diese Operationen werden meist über das Kontextmenü (mit der rechten Maustaste auf das Datenobjekt klicken) aufgerufen und dann durch gelbe, orange, blaue oder rote Rechtecke angezeigt. An jedem ausgewählten Rechteck können zusätzlich in der unteren Hälfte des Amira-Hauptfensters gewünschte Einstellungen vorgenommen werden.

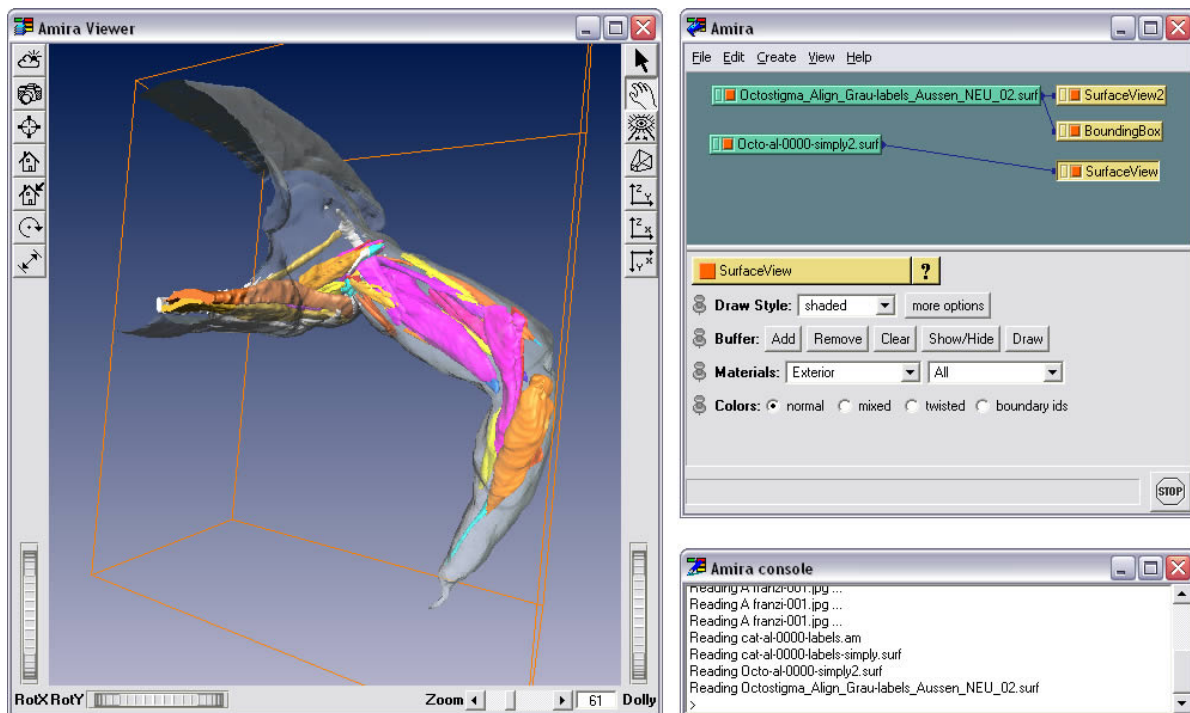


Abb. 1: Programmoberfläche: Das Hauptfenster (rechts oben), in dem hauptsächlich gearbeitet wird. Im unteren Teil des Hauptfensters können für das ausgewählte Rechteck (hier die *SurfaceView*) bestimmte Einstellungen getroffen werden. Der Viewer (links) zum Betrachten der Objekte und die Konsole (rechts unten), in der die Befehle abgearbeitet werden und etwaige Fehler aufgelistet werden.

2.3 Arbeiten und Speichern im Amira-Hauptfenster

Aufrufen von Befehlen:

Die meisten Befehle werden in Amira nicht über das Menü, sondern über das **Kontextmenü** (siehe Abb. 6) aufgerufen. Dieses ist nicht immer gleich, sondern enthält je nach ausgewähltem Objekt unterschiedliche Befehle.

Entfernen von Objekten:

Um Objekte (das sind die grünen, gelben oder roten Rechtecke) wieder zu entfernen, muss das Objekt ausgewählt (angeklickt) werden. Danach kann es durch den Befehl *Remove* entfernt werden. Den Befehl *Remove* findet man unter *Edit* in der oberen Menüleiste.

Speichern:

Die grünen Rechtecke (Datenobjekte) enthalten die eigentlichen Daten und können immer als Datei gespeichert werden. Dazu muss man in der Menüleiste unter *File, Save Data* bzw. *Save Data As...* anklicken.

Die anderen Rechtecke stehen für Operationen, die auf die Objekte angewandt wurden, werden also immer aus den grünen Rechtecken erzeugt und können demnach nicht unabhängig gespeichert werden, sondern nur mit den Grünen gemeinsam, da das Programm immer auf den Datensatz (das Objekt) zurückgreifen muss.

Daher speichert man bei Amira so genannte Netzwerke ab. Diese können als *.hx-Dateien über das Menü *File* und *Save Network ...* gespeichert werden.

Das in Abb. 2 dargestellte Netzwerk beinhaltet die Netzwerkdatei und 4 Datensätze (Objekte).

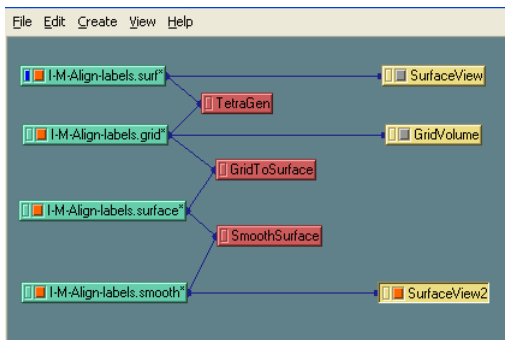


Abb. 2: Beispiel einer Netzwerk-Datei, bestehend aus vier Datenobjekten und 6 Operationsobjekten

Man erzeugt somit mit Amira sehr viele einzelne Dateien, und es besteht die Gefahr, dass man schnell den Überblick verliert. Auch beim Speichern irrt man sich dann schnell und überschreibt leicht eine Datei, die man noch benötigen würde, oder vergisst eine Datei zu speichern.

Tipp: Folgende Vorgehensweise empfehle ich:

- zuerst die Datenobjekte (grünen Rechtecke) speichern
- dann das Netzwerk speichern (*.hx)
- die wichtigen Dateien zusätzlich regelmäßig in einen Sicherungsordner kopieren.

3 Arbeiten mit Daten aus Semidünnschnitten

3.1 *Vorarbeiten und Daten ins Amira laden*

1. **Schnittserien digitalisieren**; den Mikrometerstab für die Größenbestimmung nicht vergessen!
2. Eventuell in einem Bildbearbeitungsprogramm den Kontrast erhöhen
3. Falls Volumengrafiken erstellt werden sollen, auch diese Vorarbeiten erledigen (siehe Kapitel 4. Volumengrafik (Vortex))
4. **Fotos in JPG** umwandeln, um die Datenmenge zu verringern
5. **Fotostapel ins Amira laden**

Im Amira-Hauptfenster im Menü *File* den Befehl *Load* klicken. Die Gewünschten Bilddateien auswählen (mittels Shift und/oder Strg Taste) und *Load* klicken. Dabei öffnet sich ein kleines Fenster (Image Read Parameters), dort muss der Name und die Größe des Objekts eingegeben werden (siehe Abb. 3).

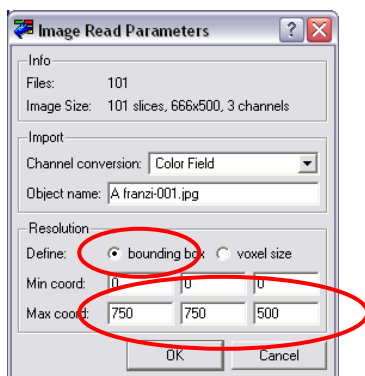


Abb. 3: Bildstapel laden: Dabei die Größe im Koordinatensystem festlegen

Am besten gibt man in Amira die tatsächlichen Größenverhältnisse in der *bounding box* in μm ein, mit dem Vorteil, dass später in Amira auch verschiedenste Messungen durchgeführt werden können.

Die x- und y-Werte können durch den fotografierten Mikrometerstab gemessen bzw. berechnet werden.

Der z-Wert ergibt sich aus Schnittdicke (Semidünnschnitte meist $1\mu\text{m}$) mal der Anzahl der Schnitte minus eins.

Tipp: Bevor man sich die Werte mühsam errechnet, zuerst probieren, ob der Bilderstapel überhaupt geladen werden kann. Dabei genügt es *Voxel Size* auszuwählen und drei mal 1 einzugeben (siehe Abb. 4).

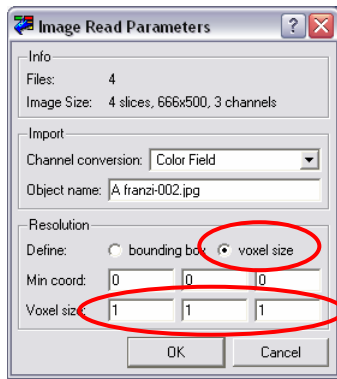


Abb. 4: Schnelleinstellung beim Laden um zu sehen, ob der Arbeitsspeicher ausreicht

Mit dem *Crop Editor* können diese Einstellung auch später noch geändert werden (siehe Abb. 5).



Abb. 5: Aufrufen des *Crop Editors*

Wenn die Datenmenge zu groß ist bzw. der Arbeitsspeicher nicht ausreicht, werden manche Bilder nicht geladen (siehe Fenster „*Amira console*“). Wenn das der Fall ist, muss man die Fotos zuschneiden, verkleinern oder komprimieren, oder die Rekonstruktion in mehreren Schritten durchführen.

Achtung: bei der Dateieindung der Bilder wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. → Die Bilder werden dann unterschiedlich geschichtet! Auch eine durchgehende Nummerierung ist notwendig.

3.2 Einzelne Schnitte aneinander ausrichten (Alignment)

Beim Digitalisieren einer Semidünnschnittserie erhält man Bilder von Einzelschnitten, die zwar gleiche Ausmaße besitzen, bei denen das Objekt jedoch nicht hundertprozentig gleich ausgerichtet ist. In einem ersten Schritt müssen deshalb die Bilder des Bildstapels dermaßen aneinander ausgerichtet (aliniert) werden, dass das Objekt in der Rekonstruktion verzerrungsfrei dargestellt werden kann.

Mit der rechten Maustaste auf das Datenobjekt klicken - *Compute-AlignSlices* auswählen (siehe Abb. 6).

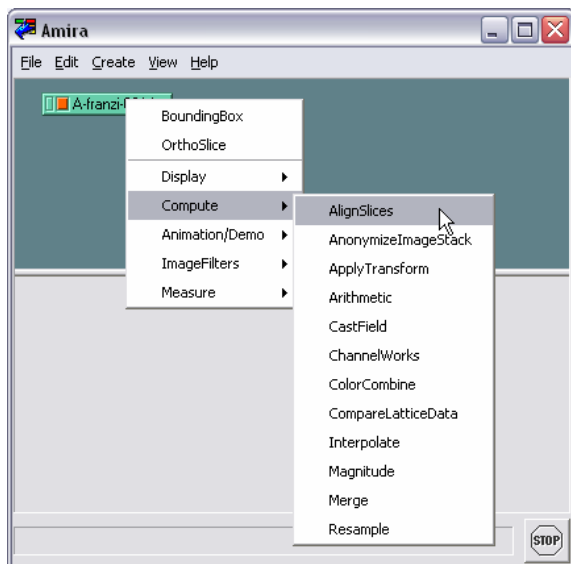


Abb. 6: Kontextmenü um zum alinieren der Schnitte zu gelangen

Edit klicken → ein eigenes Bearbeitungsfenster, der „*Slice Aligner*“, öffnet sich (siehe Abb. 7)

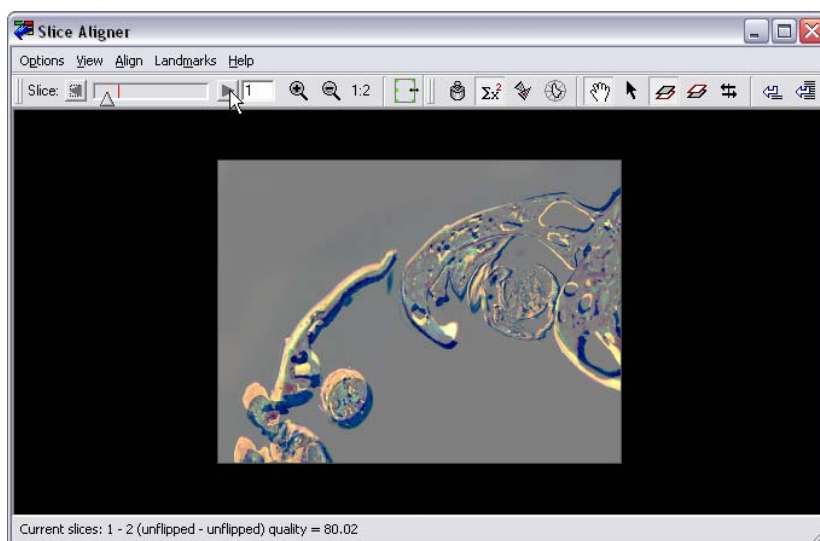


Abb. 7: Der *Slice Aligner*, in dem die Schnitte aliniert werden können

Die obere Schicht ist jeweils halbtransparent und kann mit der Maus oder den Pfeiltasten verschoben werden. Zum Drehen mit der Maus oder den Pfeiltasten muss zusätzlich die STRG-Taste gedrückt werden.

Zunächst empfiehlt es sich jedoch, eine automatische Alinierung aller Schnitte vorzunehmen. Automatisches Alinieren (*Align all slices*, siehe Abb. 8) funktioniert recht gut, eine Kontrolle und manuelle Nachalinierung ist aber notwendig. Für diese am besten mit Schicht 1 beginnen (*Slice 0* - ist links oben einstellbar).

Mittels *Slice* (Abb. 7: links oben) nach dem übereinander Ausrichten zum nächsten Schnitt wechseln.

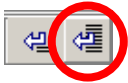


Abb. 8: Button *Align all slices*

Wichtig: Speichern nicht vergessen: *Options - Save Transformation.*

Nachdem alle Schnitte aliniert sind, kann mittels *Resample* (siehe Abb. 9) ein neues Datenobjekt (grünes Rechteck) erstellt werden. Erst dadurch wird die Alinierungsoperation wirklich auf den Datensatz ausgeführt. Man sollte Resample nicht nach jedem kleinen Alinierungsschritt ausführen, da jede Drehung einen Datenverlust mit sich zieht.

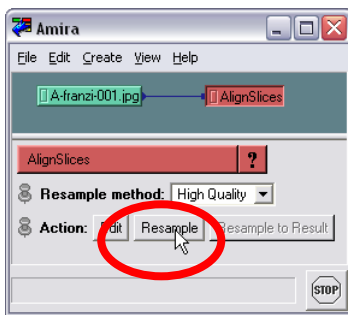


Abb. 9: Neuen Datensatz nach dem Alinieren erstellen

3.3 Information in Graustufen umwandeln

Dieser Schritt ist unbedingt notwendig, da viele der nachfolgenden Operationen bei Amira nur anhand von Grauwertunterschieden funktionieren.

Mittels *Compute* und *CastField* (Kontextmenü) in Graustufen umwandeln (siehe Abb. 10):

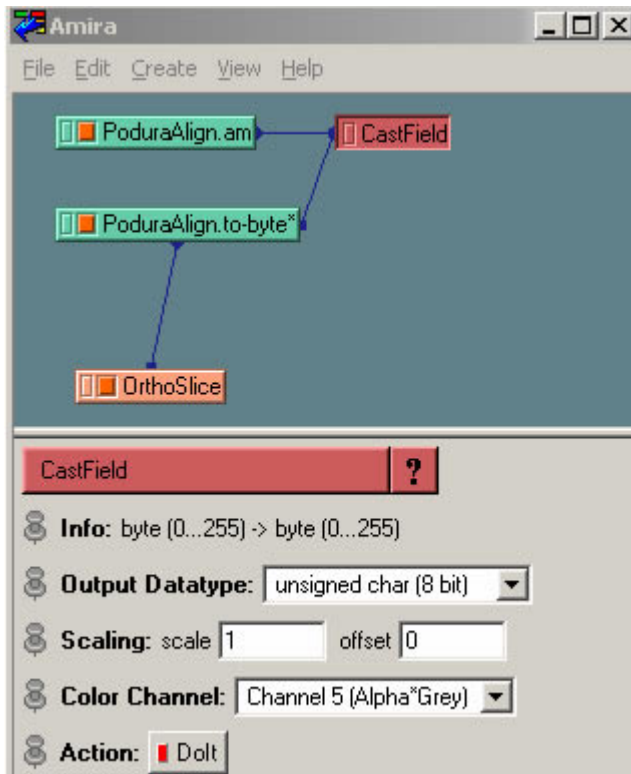


Abb. 10: Mittels *CastField* in Graustufen umwandeln

Dabei ausprobieren, mit welchem *Color Channel* man die bessere Lösung erzielt. Bei blau gefärbten Präparaten hatte ich mit „*Channel 2*“ gute Ergebnisse.

Mit der rechten Maustaste auf das Datenobjekt (grünes Rechteck) und *OrthoSlice* klicken und das Ergebnis kontrollieren.

Die Graustufenumwandlung kann selbstverständlich auch mittels anderer Software, bevor der Bildstapel in Amira geladen wird, gemacht werden (z.b. IrfanView, Adobe Photoshop etc.).

Tipp: Die alinierten Daten mit der Farbinformation nicht löschen, da manche Strukturen in Farbe später besser sichtbar sind.

4 Volumengrafik (Vortex)

Mit dem Befehl *Vortex* können sehr rasch Volumengrafiken erzeugt werden, es entsteht dabei eine semitransparente Voxel-Wolke des 3D-Datensatzes.

Vorarbeiten für Semidünnschnitte

- vorher bearbeiten der Schnitte z.B. in **Adobe Photoshop**:
 - o Negativ erzeugen: *Bild – Anpassen – umkehren* (um einen schwarzen bzw. dunkelgrauen Hintergrund zu erzeugen)
 - o Kontrast erhöhen: *Bild – Anpassen – Helligkeit/Kontrast*

Tipp 1: Mittels Aktion und Stapelverarbeitung alle Bilder automatisch umwandeln

Tipp 2: Ab der Amira Version 4 ist ein Umkehren nicht mehr notwendig, da beim Alinieren ein weißer bzw. hellgrauer Hintergrund (statt dem schwarzen) gewählt werden kann: Unter *AlignSlices* im Menü *Align – Options* auswählen, dann *Output – Background Color* – den Regler bei Gray auf z.B. 255 stellen.

Vortex erzeugen

- In Amira: Im Kontextmenü *Display – Vortex* wählen (Abb. 11)

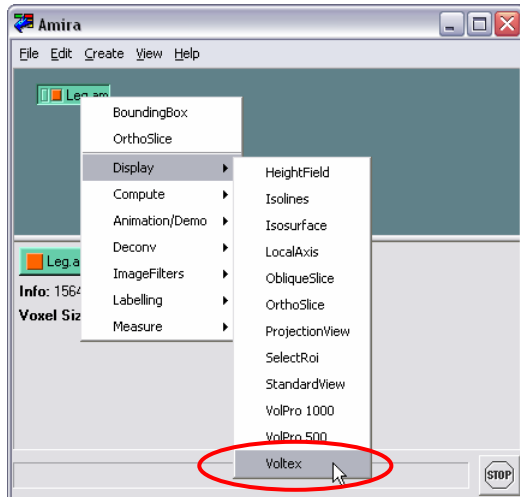


Abb. 11: *Vortex*-Befehl mittels Kontextmenü aufrufen

- Unter *Colormap*
 - o Wenn **Schnitte als Negativ** oder **MCT-Daten** vorliegen (mit schwarzem/dunkelgrauem Hintergrund): *Colormap* auf ca. *180 bis 10* wählen (siehe Abb. 12).
 - o Wenn **Amira 4 mit weißem bzw. hellgrauen Hintergrund**: *Colormap* auf ca. *10 bis 180* wählen.

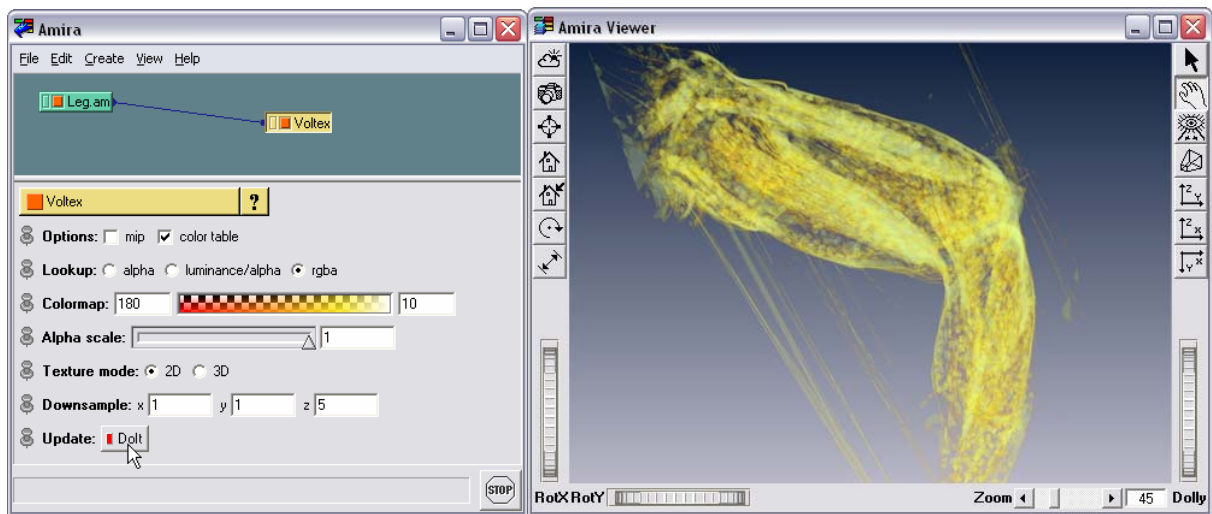


Abb. 12: Einstellungen der Voltexoptionen und das entsprechende Ergebnis im Viewer

Um ansprechende Ergebnisse zu erzielen sollte mit den Einstellungswerten (vor allem *Colormap* und *Downsample*) experimentiert werden.

5 Image Segmentation

Um die eigentliche 3D-Rekonstruktion zu ermöglichen, müssen zusammenhängende Strukturen Schnitt für Schnitt markiert werden. Das Programm erzeugt anschließend daraus eine Oberfläche.

Das entsprechende Daten-Objekt (Bildstapel) mit rechter Maustaste anklicken und im Kontextmenü *Labelling* – *LabelField* auswählen (siehe Abb. 13).

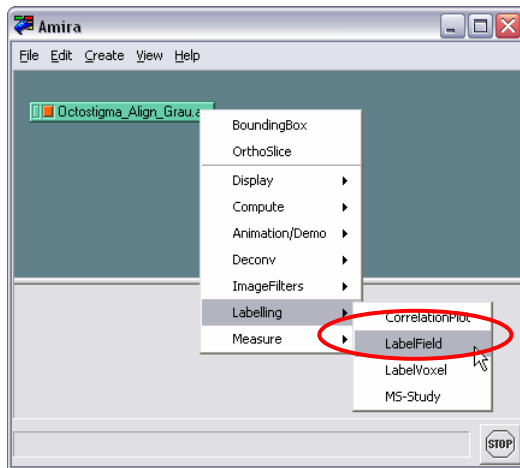


Abb. 13: Kontextmenü zum öffnen des *Image Segmentation Editor*

Daraufhin öffnet sich der *Image Segmentation Editor* (siehe Abb. 14).

Dort muss zunächst ein Material festgelegt werden: Bei *Materials* mittels Rechtsklick auf die leere Fläche *New Material* klicken.

Mit Rechtsklick auf das neue Material kann dieses umbenannt und eine andere Farbe zugewiesen werden.

Tipp: Es empfiehlt sich, Strukturen im Zweifelsfall in Unterstrukturen zu trennen, da eine Verschmelzung unterschiedlicher Materialien problemlos möglich ist, während eine Auftrennung einer Struktur schwieriger ist.

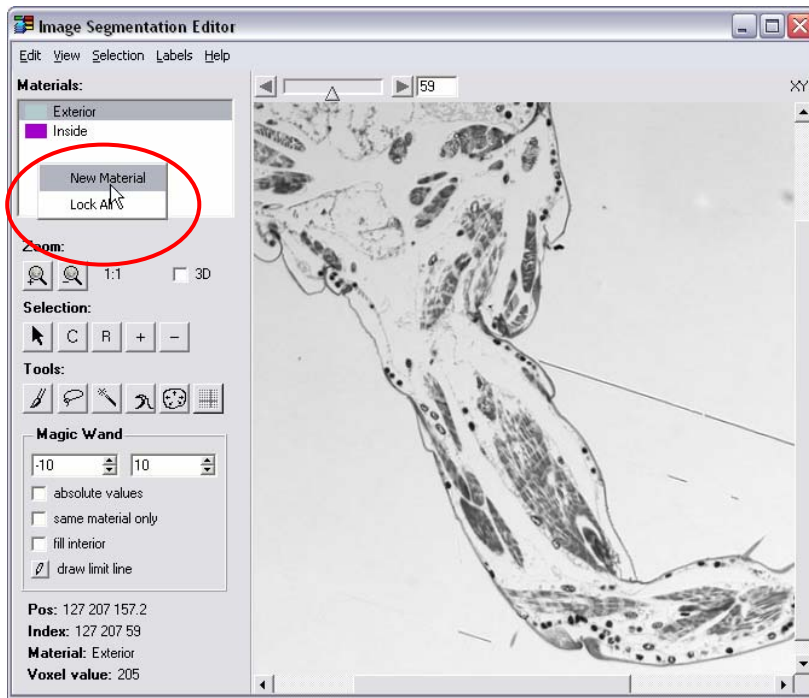


Abb. 14: *Image Segmentation Editor*: Neues Material hinzufügen

Mit dem gewählten *Tool* (empfehlenswert ist das *Lasso* oder der *Pinzel*) die gewünschte morphologische Struktur markieren und **+** oder **R** klicken (erst dadurch wird die Markierung übernommen). Anschließend mit dem Schieber (oben) zum nächsten Schnitt wechseln (Abb. 15).

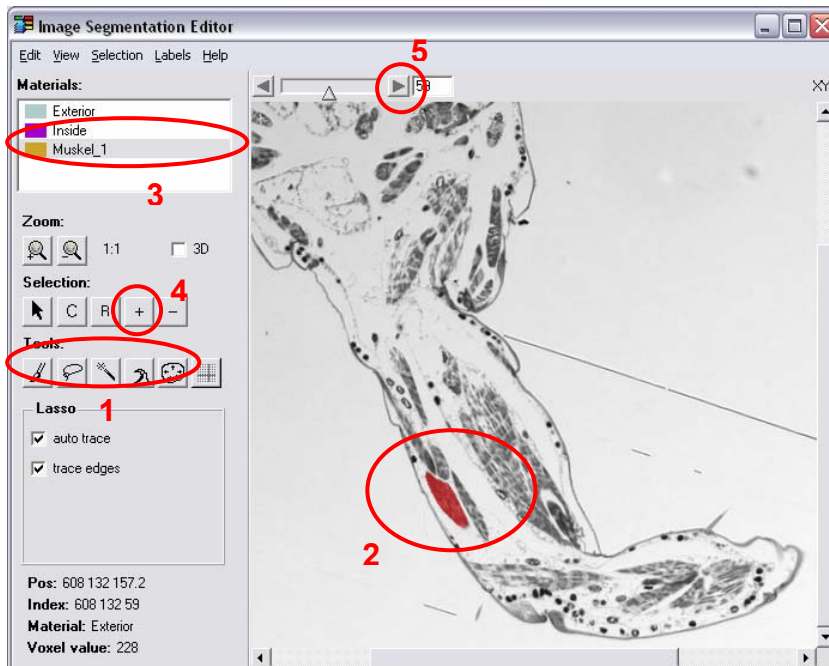


Abb. 15: Wichtigste Arbeitsschritte im *Image Segmentation Editor*: Werkzeug (unter *Tools*) auswählen (1), Struktur markieren (2), Material auswählen (3), markierte Struktur dem Material zuweisen (4) und zum nächsten Schnitt wechseln (5)

Die Selection-Buttons:

..... zum Auswählen eines bereits erzeugten Labels z.B. für die Interpolierung (siehe unten)



..... löscht die rote Markierung



..... setzt die rote Markierung als Label statt des alten Labels



..... fügt die rote Markierung zum Label hinzu



..... rote Markierung wird vom Label abgezogen

Tastaturbefehle:

Zum schnelleren Arbeiten folgende Tasten verwenden:

+..... rote Auswahl (Markierung) hinzufügen

- rote Auswahl (Markierung) abziehen

C rote Auswahl löschen

→(Cursortaste) nächster Schnitt

Speichern:

Die Image Segmentation ist ein sehr arbeitsaufwendiger Schritt. Zum zwischendurch Speichern einfach ins Amira-Hauptfenster wechseln und das neue grüne Datenobjekt: „*-labels“ abspeichern (*File / Save Data*).

Interpolieren:

Um Arbeitszeit zu sparen oder schlechte Schnitte zu umgehen, kann auch automatisch interpoliert werden. Die Segmentierung einer Struktur muss dafür auf zwei Schnitten markiert (rot) werden (unabhängig davon wie viele Schnitte zwischen den Markierungen liegen) und im Menü *Selection / Interpolate* klicken.

Wichtig:

Um zu einem späteren Zeitpunkt im *Image Segmentation Editor* weiter arbeiten zu können müssen sowohl die Ausgangsdatei mit den Schnittserien, als auch die Datei mit den

Materialien und den Labels (Segmentierungen) geöffnet werden. Es empfiehlt sich, die beiden Dateien gemeinsam als Netzwerk zu speichern (siehe Abb. 16).

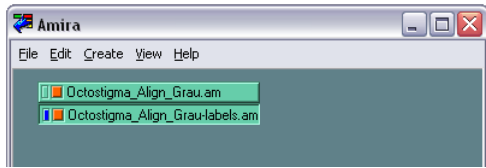


Abb. 16: Zwei Dateien werden für die Bearbeitung im *Image Segmentation Editor* benötigt: Die Datei mit den Schnittfotos und die Datei mit den Label-Informationen.

6 Oberflächen erzeugen

Sobald alle benötigten Strukturen im *Image Segmentation Editor* festgelegt sind, können die Oberflächen erzeugt werden. Mit der rechten Maustaste im Amira Hauptfenster auf das entsprechende Datenobjekt klicken (*-labels.am) und *SurfaceGen* auswählen.

Gewünschte Einstellungen vornehmen und *Triangulate* klicken (siehe Abb. 17).

Warnungsfenster ignorieren und *Continue* klicken. Ein neues Datenobjekt mit der Datei-Endung „surf“ wird generiert **Tipp:** Speichern nicht vergessen.



Abb. 17: Diese Einstellungen unter *SurfGen* liefern gute Ergebnisse

6.1 Datenmenge reduzieren und glätten

Die *.surf Datei markieren und den *Simplifier* auswählen. Z.B. bei *Faces* einen geringeren Wert eingeben und *Simplify now* klicken (siehe Abb. 18).

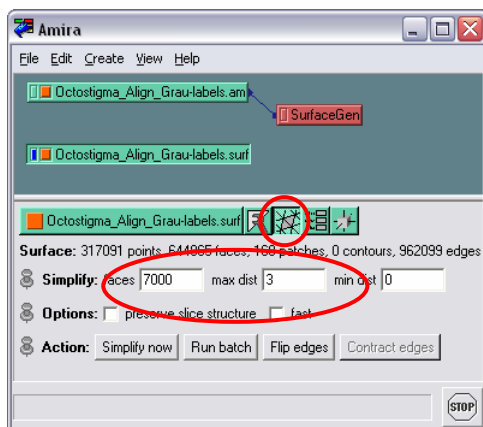


Abb. 18: Im *Simplifier* kann die Datenmenge erheblich reduziert werden.

Zum Glätten der Oberfläche mit der rechten Maustaste auf die *.surf-Datei klicken und *Compute – SmoothSurface - Dolt* klicken (siehe Abb. 19).

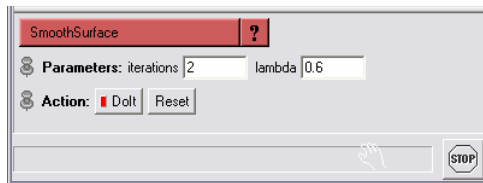


Abb. 19: Oberfläche glätten

Achtung: Das Vereinfachen mit dem *Simplifier* bzw. das Glätten (*SmoothSurface*) verringert zwar die Datenmenge und kann zu schöneren Ergebnissen führen (so etwa die Treppung kompensieren), allerdings können auch Strukturen verloren gehen! Daher sollte das Ergebnis auch mit den Originalschnitten verglichen werden.

6.2 Oberfläche anzeigen

Wieder mit der rechten Maustaste auf die *.surf-Datei und *SurfaceView* klicken

Durch auswählen einzelner Materialien können einzelne Materialien aus- bzw. eingeblendet werden (siehe Abb. 20).

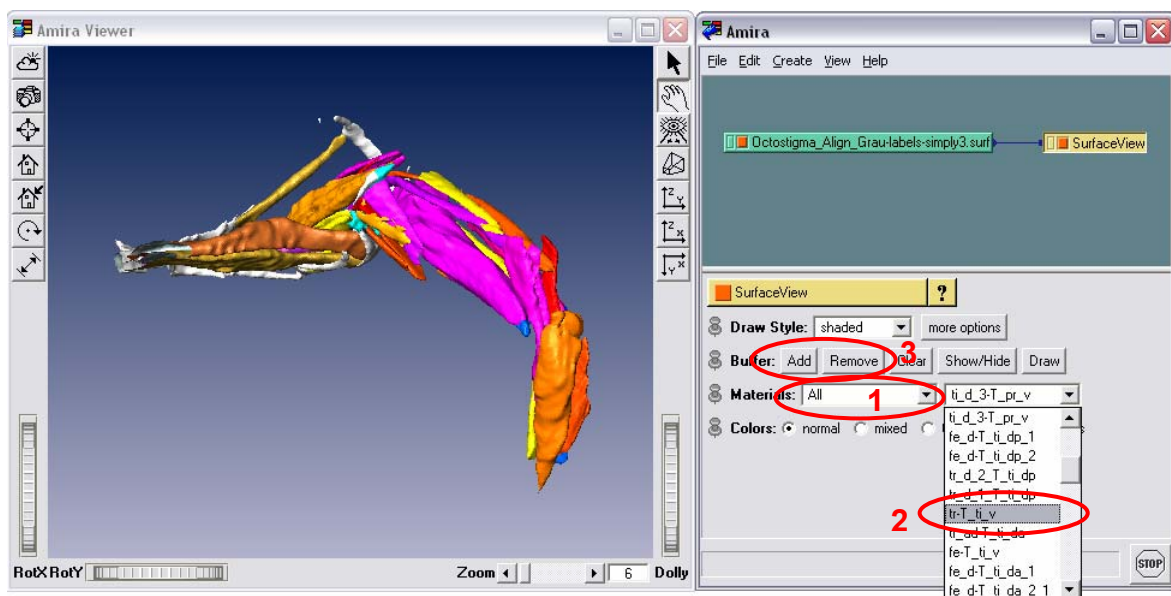
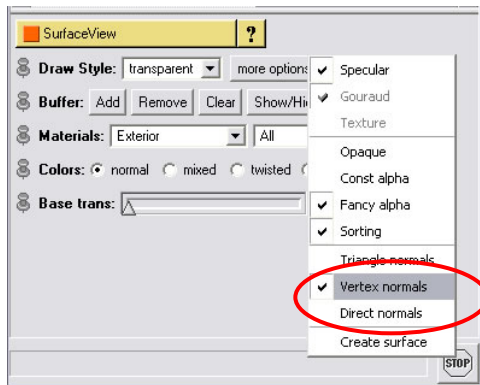
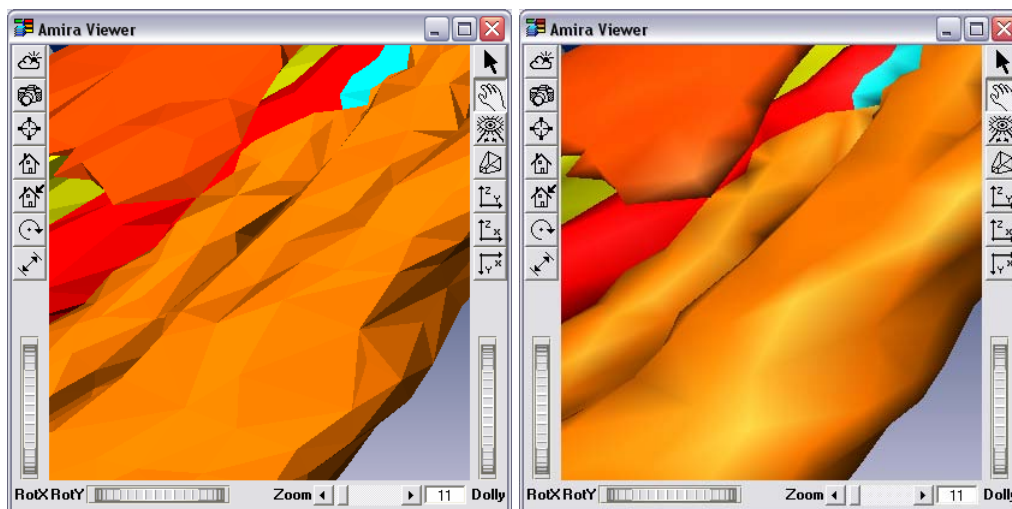


Abb. 20: Einzelne Materialien (morphologische Strukturen) ein- bzw. ausblenden: Schritte 1-3

Tipp: Bei Umstellung von *Triangle normals* auf *Vertex normals* kann eine glattere Oberfläche erreicht werden. Dazu unter *Draw Style* und *more options* – *Vertex normals* auswählen (siehe Abb. 21 und Abb. 22).

Abb. 21: SurfaceView: *Vertex normals*Abb. 22: Unterschied bei Änderung der Draw Style Einstellung: *Triangle normals* (links) und *Vertex normals* (rechts)

Tipp: Die *SurfaceView* einer zweiten Datei oder eine zweite *SurfaceView* derselben Datei kann angezeigt werden, um einige Materialien (z.B.: die Außenhülle) transparent darzustellen (siehe Abb. 23).

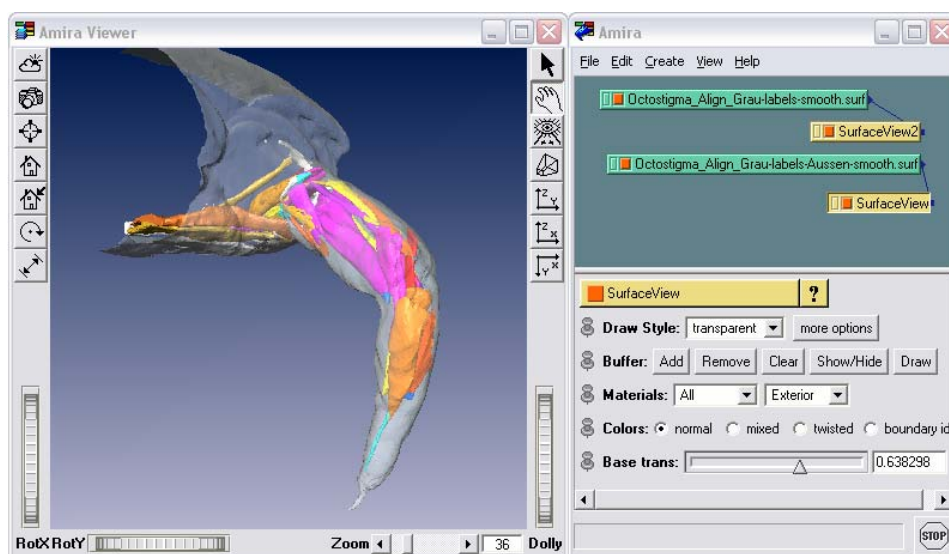


Abb. 23: Zwei Datenobjekte mit je einer Oberflächenansicht, aber unterschiedlichen Transparenz-Einstellungen.

7 Ergebnisse veröffentlichen

7.1 *Snapshot*

Der Inhalt im *Viewer* kann über *Snapshot* (Abb. 24: 1) als Bitmap-Bild gespeichert werden. Für Bildschirmpräsentationen reicht die Standardeinstellung. Wenn Druckqualität erforderlich ist, die Werte unter *Render tiles* entsprechend erhöhen (Abb. 24: 2).

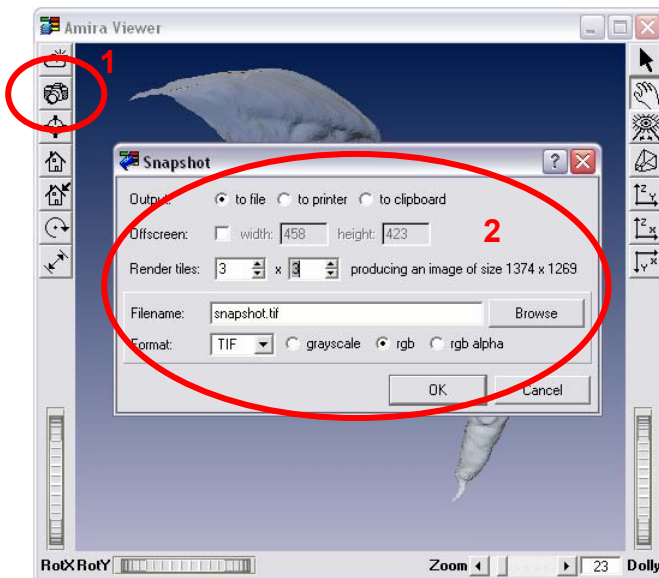


Abb. 24: Den Inhalt im *Viewer* als Bild speichern

Tipp: Auf Wunsch kann mit diesem Button  die Hintergrundfarbe geändert werden.

7.2 *VRML-Export*

Beim VRML-Export bleiben die räumlichen Informationen erhalten und das Objekt kann über einen VRML-Viewer plattformübergreifend betrachtet werden. Meist sind dabei die Grundfunktionen wie Drehen und Zoomen verfügbar.

Verschiedenste VRML-Viewer sind kostengünstig bzw. gratis im Internet zu finden.

Das entsprechende Datenobjekt auswählen und über das Kontextmenü *Compute* und *VRML-Export* aufrufen. Mit dem Button *Dolt* den Export starten (siehe Abb. 25).

Hinweis: Bei etwas komplexeren Oberflächen bewältigt Amira 3 den VRML-Export nicht mehr. Dieses Problem konnte mit der neuen Version 4 behoben werden.

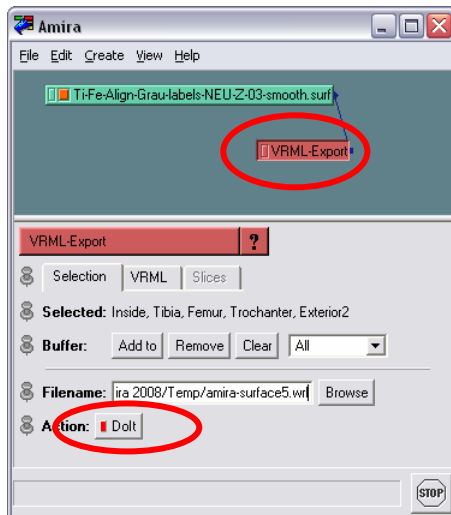


Abb. 25: VRML-Export

7.3 Video erstellen

Relativ einfach kann auch ein Video erstellt werden, bei dem sich das Objekt um eine Achse dreht. Dazu zuerst die gewünschten *SurfaceView* Einstellungen vornehmen. Dann im normalen Menü *Create* und *CameraRotate* wählen. Dort die gewünschte Drehachse festlegen. Anschließend mit der rechten Maustaste auf *CameraRotate* (Abb. 26: 1) klicken und über das Kontextmenü *MovieMaker* (Abb. 26: 2) aufrufen. Mittels *Create Movie* (Abb. 26: 3) wird die Operation ausgeführt und das Video abgespeichert.

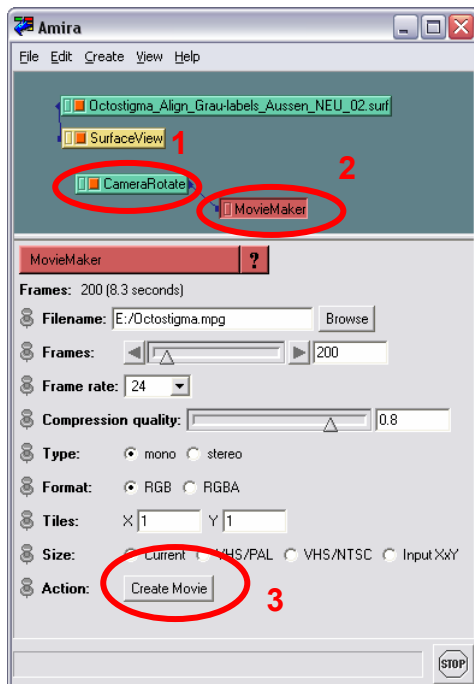


Abb. 26: Notwendige Schritte um ein MPEG-Video zu erstellen

Es können aber auch weit komplexere Animationen erstellt werden, die anschließend als Video gespeichert werden können. Siehe Kapitel 8.

8 Weiterführende Information

Für ein weiteres Einarbeiten in Amira empfehle ich die englischsprachigen Tutorials und die Häufigsten Fragen (*FAQ*) in der Amira Hilfe.

Aufzurufen im Menü über *Help – User's Guide – Tutorials* bzw. – *FAQ*

Empfehlenswert sind folgende Tutorials:

Alinieren:

- *Slice alignment - how to align physical cross-sections*

Image Segmentation und Oberflächen erzeugen:

- *Image segmentation - segmentation of 3D image data*
- *Surface reconstruction - surface reconstruction from 3D images*

Animation und Video export:

- *Creating animated demonstration - working with the DemoMaker module*
- *Creating movie files - how to use the MovieMaker module*